

Institut für Veterinärphysiologie  
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. Max Gassmann  
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Thomas Lutz

**Wirkung von inversen Ghrelin Agonisten auf die Futteraufnahme  
und neuronale Aktivität im hypothalamischen Nucleus arcuatus in  
Mäusen**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

**Melanie Hutter**

Tierärztin  
von Graz, Österreich

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. Thomas Riediger, Referent

Prof. Dr. Wolfgang Langhans, Korreferent

Zürich 2015

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>4</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>5</b>
<b>2. SUMMARY</b>	<b>6</b>
<b>3. EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
<b>3.1 Steuerung des Energiehaushaltes</b>	<b>7</b>
<u>3.1.1 Sättigungssignale</u>	7
<u>3.1.2 Adipositas Signale</u>	8
<b>3.2 Der hypothalamische Nucleus arcuatus</b>	<b>9</b>
<b>3.3 Ghrelin</b>	<b>10</b>
<u>3.3.1 Einfluss von Ghrelin und Insulin auf die Glukosehomöostase</u>	11
<b>3.4 Strategien und therapeutische Intervention gegen Übergewicht</b>	<b>12</b>
<b>3.5 Ziel der Studie</b>	<b>14</b>
<b>4. MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>16</b>
<b>4.1 Tiere</b>	<b>16</b>
<b>4.2 C-Fos Studien</b>	<b>16</b>
<u>4.2.1 Injektion und Perfusion</u>	16
<u>4.2.2 Gehirnschnitte</u>	17
<u>4.2.3 Immunhistologische c-Fos Detektion</u>	18
<u>4.2.4 Quantifizierung und statistische Auswertung</u>	19
<b>4.3 Fütterungsstudien</b>	<b>20</b>
<u>4.3.1 Vorbereitung</u>	20
<u>4.3.2 Versuchsdurchführung</u>	20
<u>4.3.3 Statistische Auswertung</u>	21
<b>4.4 Aversionsstudie</b>	<b>21</b>
<u>4.4.1 Konditionierte Geschmacksaversion mit Saccharin</u>	21
<u>4.4.2 Statistische Auswertung</u>	22
<b>5. ERGEBNISSE</b>	<b>23</b>
<b>5.1 c-Fos Studien</b>	<b>23</b>
<u>5.1.1 Einfluss des inversen Ghrelin Agonisten IA1 auf die fasteninduzierte c-Fos Expression</u>	23
<u>5.1.2 Einfluss des inversen Ghrelin Agonisten IA2 auf die fasteninduzierte c-Fos Expression</u>	24
<u>5.1.3 Einfluss des inversen Ghrelin Agonisten IA3 auf die fasteninduzierte c-Fos Expression</u>	25
<b>5.2 Fütterungsstudien</b>	<b>27</b>
<u>5.2.1 Einfluss von IA2 auf die Futteraufnahme nach subkutaner Injektion</u>	27
<u>5.2.2 Einfluss von IA3 auf die Futteraufnahme nach subkutaner Injektion</u>	27
<u>5.2.3 Einfluss von IA3 auf die Futteraufnahme nach oraler Applikation</u>	28

<b>5.3 Aversionsstudie</b>	<b>29</b>
<u>5.3.1 Einfluss von IA3 auf die Auslösung einer Geschmacksaversion</u>	29
<b>6. DISKUSSION</b>	<b>30</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>37</b>
<b>8. DANKSAGUNG</b>	
<b>9. LEBENSLAUF</b>	

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon
AG	Acyliertes Ghrelin
AgRP	Agouti related protein
ARC	Nucleus arcuatus
CART	Cocaine and Amphetamine regulated Transcript
CCK	Cholecystokinin
CTA	Konditionierte Geschmacksaversion - conditioned taste aversion
DAB	Diaminobenzidin
DMAC	Dimethylacetamid
GH	Growth Hormon
Ghrl	Ghrelin-Gen
GHS-R	Growth-Hormon-Secretagogue Rezeptor
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLP-1	Glucagon-like Peptide-1
GOAT	Ghrelin-O-Acyltransferase
IA	Inverser Ghrelin Agonist
LHA	Lateraler Nucleus des Hypothalamus
NDS	Normal Donkey Serum
NGS	Normal Goat Serum
NTS	Nucleus tractus solitarii
NPY	Neuropeptid Y
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Triton
PFA	Paraformaldehydlösung
POMC	Proopiomelanocortin
PVN	Paraventriculärer Nucleus im Hypothalamus
PYY	Peptid YY
TRISHCl	Tris Salzsäure
UAG	Unacyliertes Ghrelin
ZDF	zucker diabetic fatty

## 1. Zusammenfassung

Der hypothalamische Nucleus arcuatus (ARC) ist eine wichtige Zielstruktur für metabolische und hormonelle Signale, welche die Energiehomöostase steuern. Das orexigen wirksame Hormon Ghrelin induziert durch Bindung an seinen Rezeptor (GHS-R) eine Steigerung der Nahrungsaufnahme, Gewichtszunahme und hemmt zudem peripher die Insulinsekretion. Aufgrund der hohen konstitutiven Aktivität des GHS-R wird für inverse Ghrelin Agonisten (IA) eine bessere therapeutische Wirksamkeit zur Reduktion der Nahrungsaufnahme als für GHS-R Antagonisten vermutet.

In immunhistochemischen Studien wurde untersucht, ob neuartige nicht-peptiderge IA einer durch Futterentzug induzierten neuronalen Aktivierung (c-Fos Expression) im ARC entgegenwirken. Ausserdem wurde in Verhaltensstudien getestet, ob die Nahrungsaufnahme durch IA reduziert wird. Durch einen Geschmacksaversionstest sollte ferner eine aversive Wirkung von IA ausgeschlossen werden.

Die fasteninduzierte c-Fos Expression wurde durch IA Gabe im Vergleich zur gefasteten Kontrollgruppe deutlich abgeschwächt. Des Weiteren wurde die Futteraufnahme nach Applikation der IA (s.c. u. p.o.) bis zu 24h reduziert. Im Gegensatz zur aversiven Positivkontrolle LiCl, induzierte eine IA Behandlung keine Aversion gegen Saccharin.

Die Resultate dieser *in vivo* Studien sind konsistent mit der postulierten Wirkungsweise der getesteten IA und legen eine mögliche therapeutische Verwendung zur Behandlung von Adipositas nahe.

## 2. Summary

The arcuate nucleus (ARC) is a receptive region for metabolic and hormonal signals controlling food intake. Ghrelin is the only known orexigenic hormone in the circulation. It binds to the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) and increases food intake and weight gain but also suppresses the insulin secretion. Due to the high constitutive activity of GHS-R ghrelin inverse agonists (IA) are assumed to provide additional *in vivo* efficacy over a GHS-R antagonist and therefore to reduce food intake.

Using immunohistochemistry we examined if novel non-peptidergic IA reverse the fasting-induced neuronal activity (c-Fos expression) in the ARC. In behavioral studies we investigated if IA reduce food intake. In addition a conditioned taste aversion study (CTA) with saccharin was performed to exclude an aversive effect of the IA.

The fasting-induced c-Fos expression was reduced by IA treatment compared to the fasted control group. In feeding studies, IA (s.c. and p.o.) reduced food intake up to 24 hours. The administration of IA did not cause visceral illness and aversion to saccharin in comparison to the positive control group (LiCl). Therefore a mediation of the hypophagic effect by an aversive mechanism can be excluded. In summary, based on these results, IA may be beneficial for the treatment of obesity.

### 3. Einleitung

#### 3.1 Steuerung des Energiehaushaltes

Ziel des Energiehaushaltes ist, dem Körper genügend Energie für seine Stoffwechselgänge zur Verfügung zu stellen. Wenn der Energieumsatz nicht ausgewogen ist und zu viel oder zu wenig Nahrung im Vergleich zum täglichen Bedarf zugeführt wird, kann das Körpergewicht zu- bzw. abnehmen (Berridge, 2004). Verschiedene hormonelle Signale nehmen Einfluss auf die Energiehomöostase. Zum einen sind dies Sättigungssignale aus dem Gastrointestinaltrakt (GIT), die während einer Mahlzeit freigesetzt werden und zu einer Sättigung bzw. zu einer Beendigung der Mahlzeit führen. Zum anderen sind dies Adipositas Signale wie Leptin oder Insulin, deren Sekretion mit der Grösse der Fettdepots korreliert und die unter anderem über eine zentralnervöse vermittelte Reduktion der Nahrungsaufnahme das Körpergewicht reduzieren (Woods et al., 2004).

##### 3.1.1 Sättigungssignale

Durch die Nahrungsaufnahme wird die Freisetzung von gastrointestinalen Hormonen wie Cholecystokin (CCK) induziert (Gibbs et al., 1973). Viele dieser Sättigungssignale wirken über eine Stimulierung von vagalen afferenten Fasern, die zum Nucleus tractus solitarii (NTS) projizieren (Morton et al., 2006). Neben der vagal vermittelten Hemmung der Nahrungsaufnahme beeinflusst CCK hormonell die Darmmotilität, Kontraktion der Gallenblase, Sekretion von Pankreasenzymen, Magenentleerung und Magensäurenbildung (Grider, 1994; Schwartz et al., 1997; Chandra und Liddle, 2007; Raybould, 2007). Neben CCK gibt es noch weitere gastrointestinale Hormone, die eine Sättigung bewirken. Dazu zählen unter anderem Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) (Näslund et al., 2004), Peptid YY (PYY) (Batterham et al., 2004) und Amylin (Lutz et al., 1994).

PYY und GLP-1 werden nach der Nahrungsaufnahme im Dünndarm sezerniert (Kreymann et al., 1987; Orskov et al., 1996; Challis et al., 2003; Chelikani et al., 2005; Vrang et al., 2006). Beide Darmhormone bewirken eine Reduktion der Mahlzeitengrösse (Batterham et al., 2002; Kinzig et al., 2002). Amylin wird mit Insulin von den  $\beta$ -Zellen des Pankreas in Antwort auf die Nahrungsaufnahme kosezerniert (Lutz et al., 1994; Lutz et al., 1995; Arnelo et al., 1998). Die Zielstruktur des

anorektischen Hormons ist die Area postrema im Hirnstamm. Alle drei Hormone reduzieren die Nahrungsaufnahme durch zentral vermittelte Wirkung auf ihre entsprechenden Regionen im Gehirn (Kreymann et al., 1987; Lutz et al., 1994; Lutz et al., 1995; Orskov et al., 1996; Arnelo et al., 1998; Näslund et al., 2004). Zudem spielt GLP-1 eine wichtige Rolle in Bezug auf die Kontrolle der Glukosehomöostase, indem es für etwa 60% der postprandialen Insulinsekretion verantwortlich ist und somit eine Inkretin Wirkung ausübt. Inkretine sind gastrointestinale Hormone, welche die Insulinsekretion aus den pankreatischen  $\beta$ -Zellen steuern (Creutzfeld, 1979; Nauck et al., 1986; Holst, 2007).

### 3.1.2 Adipositas Signale

Neben den Sättigungshormonen steuern Adipositas Hormone den Energiehaushalt. Dazu zählen Insulin und Leptin, die mit zunehmendem Körperfettanteil vermehrt freigesetzt werden. Insulin wird von den  $\beta$ -Zellen des Pankreas sezerniert und senkt den Blutglukosespiegel, indem Glukose in die Zellen aufgenommen wird (Woods et al., 2003; Banks, 2006). Leptin ist ein 16kDa Protein, das vom weissen Fettgewebe sezerniert wird. Ein genetischer Mangel von Leptin oder dessen Rezeptor führt zu einem adipösen Phänotyp und erhöhter Futteraufnahme (Zhang et al., 1994; Chua et al., 1996). Beide Hormone binden an spezifische Rezeptoren im Hypothalamus und beeinflussen die Energiehomöostase, indem orexigene Neurone gehemmt und anorexigene stimuliert werden (Spanswick et al., 1997; Cowley et al., 2001).

Zentral appliziertes Insulin bzw. hohe Leptinspiegel führen zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme, einem gesteigerten Energieumsatz und Gewichtsverlust. Im Gegensatz dazu resultiert aus einer Abnahme dieser Adipositas Hormone ein erniedrigter Energieumsatz, erhöhte Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme (Baskin et al., 1999; Cowley et al., 2001). Bei Gewichtsabnahme sinken die Leptin- und Insulinspiegel im Blut. Ein Teil der Wirkung der Adipositas Signale basiert auf einer Modulation von Sättigungssignalen wie CCK, deren Effekt auf die Nahrungsaufnahme verstärkt wird (Riedy et al., 1995; Matson et al., 1997; Emond et al., 1999; Matson et al., 2000; Emond et al., 2001).

Der Serumspiegel von Leptin ist auch bei übergewichtigen Menschen erhöht, was langfristig zu einer Leptinresistenz und somit zu einer Beeinträchtigung der Steuerung des Energiehaushaltes führt (Heymsfield et al., 1999). Die wichtigste



Zielstruktur des lipostatischen Hormons Leptin ist der Nucleus arcuatus (ARC) im Hypothalamus (Spanswick et al., 1997; Cowley et al., 2001).

### **3.2 Der hypothalamische Nucleus arcuatus**

Der ARC ist eine wichtige hypothalamische Zielstruktur für hormonelle und metabolische Signale, welche die Nahrungsaufnahme und Energiehomöostase steuern. Er nimmt aufgrund seiner rezeptiven Funktion für Adipositas- und Sättigungssignale einen besonderen Stellenwert bei der Steuerung der Energiehomöostase ein (Elmquist et al., 2005; Berthoud, 2006; Meister, 2007). Der ARC liegt an der Basis des dritten Ventrikels in unmittelbarer Nähe zur Eminentia mediana und der Hypophyse (Chronwall, 1985). Er enthält zwei funktionell antagonistische Subpopulationen von Neuronen, die das orexigene Neuropeptid Y (NPY) und Agouti related protein (AgRP) (Broberger et al., 1998) bzw. das anorektisch wirkende  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon ( $\alpha$ -MSH) exprimieren.  $\alpha$ -MSH ist ein Produkt des Proopiomelanocortin Gens (POMC) (sogenannte POMC Neurone) (Ellacott und Cone, 2004). Eine Aktivierung orexigener Neurone (NPY/AgRP) stimuliert die Nahrungsaufnahme, wohingegen eine Aktivierung anorexigener (POMC) Neurone diese hemmt (Willesen et al., 1999). Beide Neuronenpopulationen projizieren an andere hypothalamische Gebiete, wie dem paraventriculären Nucleus (PVN) und dem lateralen Nucleus des Hypothalamus (LHA) (Kalra et al., 1999). Der ARC erhält ebenfalls neuronale Afferenzen aus anderen Teilen des Hypothalamus und dem Hirnstamm (Chronwall, 1985). NPY exprimierende Neurone aus dem ARC projizieren zum PVN und bewirken über eine NPY Freisetzung eine Stimulation der Nahrungsaufnahme und eine Hemmung des Energieumsatzes; eine vermehrte Ausschüttung des anorektischen  $\alpha$ -MSH jedoch führt zu einer Verminderung der Nahrungsaufnahme und einem gesteigerten Energieumsatz (Woods et al., 1998).

Beide Neuronenpopulationen besitzen Rezeptoren für Leptin und Insulin (Willesen et al., 1999; Schwartz et al., 2000; Gekle, 2010). Leptin übt seine Wirkung über den ARC aus, indem es die orexigenen Neurone hemmt und die anorexigenen Neurone aktiviert (Spanswick et al., 1997; Cowley et al., 2001).

Der ARC wird nicht nur durch die oben beschriebenen Hormone, sondern auch durch den Energiestatus beeinflusst. Immunhistochemische Studien, in denen c-Fos als

Marker für neuronale Aktivierung detektiert wurde, zeigen eine starke c-Fos Expression nach 12 Stunden Futterentzug. Diese Aktivierung tritt hauptsächlich in NPY Neuronen auf. 90-94% der durch Fasten aktivierten Neurone exprimieren NPY, wohingegen eine fasteninduzierte c-Fos Expression in POMC Neuronen nicht nachweisbar ist (Coppola et al., 2007; Becskei et al., 2009b). Die fasteninduzierte Aktivierung des ARC wird durch eine Fütterung nach Futterentzug (engl. *refeeding*) aufgehoben (Riediger et al., 2004). Auch die Verabreichung exogener Stimuli, wie z.B. PYY, Glukose oder Leptin, führt zu einer Reduktion der fasteninduzierten c-Fos Expression im ARC (Traebert et al., 2002; Riediger et al., 2004; Becskei et al., 2008; Becskei et al., 2009b). Diese Befunde gelten als ein *in vivo* Korrelat der Effekte auf neuronaler Stufe, die für diese Stimuli auf Einzelzellebene nachgewiesen wurden.

### 3.3 Ghrelin

Ghrelin ist ein weiteres wichtiges Hormon, dessen zentrale Effekte über den ARC vermittelt werden. Das orexigene Peptidhormon besteht aus 28 Aminosäuren und wurde erstmals 1999 im Magen von Ratten identifiziert. Das Hormon wird primär in der Magenmukosa produziert (Kojima et al., 1999). Die Ghrelinspiegel werden durch die Nahrungsaufnahme moduliert. Bei Hunger bzw. kurz vor Mahlzeiten steigt die Ghrelinkonzentration, wohingegen bei Nahrungs- oder Glukoseaufnahme die Konzentration im Plasma sinkt (Tschöp et al., 2000; Asakawa et al., 2001; Cummings et al., 2001; Toshinai et al., 2001; Shiiya et al., 2002). Es hemmt die Glukose stimulierte Insulinsekretion aus dem Pankreas und erhöhte Glukoseproduktion in der Leber und fördert den Fettabbau durch vermutlich periphere Effekte über den Growth-Hormon-Secretagogue Rezeptor (GHS-R) auf die  $\beta$ -Zellen und Adipozyten (Dezaki et al., 2004; Wierup et al., 2004; Rodríguez et al., 2009). Im Kreislauf kommt Ghrelin als acylierte (AG) und als unacylierte (UAG) Form vor (Kojima et al., 1999). Die Acylierung wird durch das Enzym Ghrelin-O-Acyltransferase (GOAT) katalysiert (Gutierrez et al., 2008; Yang et al., 2008). Die Acylierung durch GOAT ist für die biologische Aktivität von Ghrelin notwendig (Bednarek et al., 2000; Matsumoto et al., 2001; Gauna et al., 2007). Ghrelin ist der endogene Ligand für den GHS-R, welcher im ARC des Hypothalamus in hoher Dichte exprimiert wird (Howard et al., 1996; Willesen et al., 1999). Es induziert zentral über den ARC eine Steigerung des Appetits, Gewichtszunahme und Senkung des Energieumsatzes (Nakazato et al.,

2001). Das Peptidhormon hat gegensätzliche Wirkungen zu Leptin. Im ARC aktiviert es direkt Neurone, welche NPY exprimieren und inhibiert zudem indirekt die POMC Neurone (Hewson et al., 1999; Traebert et al., 2002). Der erregende Effekt von Ghrelin auf ARC Neurone wurde durch immunhistochemische c-Fos Studien bestätigt (Traebert et al., 2002; Riediger et al., 2003). Exogenes Ghrelin induziert eine starke c-Fos Expression im ARC von Mäusen, welche ähnlich der fasteninduzierten neuronalen Aktivierung ist (Traebert et al., 2002; Wang et al., 2002; Morikawa et al., 2004).

### 3.3.1 Einfluss von Ghrelin und Insulin auf die Glukosehomöostase

Ghrelin und Insulin spielen eine wichtige Rolle für die Glukosehomöostase. Das Hormon Insulin wird von den  $\beta$ -Zellen des Pankreas in Antwort auf erhöhte postprandiale Glukosespiegel sezerniert. Es führt zu einer Senkung des Glukosespiegels, indem Glukose in die Zellen aufgenommen wird (Woods et al., 1979); zudem steigert es in der Leber die Glykogensynthese (Rosetti und Giaccari, 1990) bzw. hemmt die Glukoneogenese (Yki-Jarvinen et al., 1989) und Glykogenolyse (Petersen et al., 1998). Insulin fördert zudem die Lipogenese unter anderem durch Aufnahme von Glukose in Adipozyten (Lane et al., 1990).

Sowohl Ghrelin als auch der GHS-R werden in den Langerhans-Inseln des Pankreas exprimiert (Date et al., 2002; Ponery et al., 2002; Volante et al., 2002; Wierup et al., 2002; Dezaki et al., 2004; Wierup et al., 2004; Kageyama et al., 2005). Innerhalb der Langerhans-Inseln des Pankreas wurde die Expression von Ghrelin in den  $\alpha$ -Zellen,  $\beta$ -Zellen und  $\epsilon$ -Zellen entdeckt.  $\epsilon$ -Zellen sind zudem in Teilen der Magenmukosa lokalisiert und synthetisieren Ghrelin (Wierup et al., 2002). GHS-R ist auch zum Teil in den Insulin-positiven  $\beta$ -Zellen der Pankreasinseln lokalisiert (Granata et al., 2007). In isoliertem perfundierten Rattenpankreas hemmt Ghrelin die Glukose stimulierte Insulinsekretion (Egido et al., 2002). Das orexigene Hormon blockiert auch die Insulinsekretion in immortalisierten  $\beta$ -Zellen und in kultivierten Pankreasinseln von Mäusen (Salehi et al., 2004; Wierup et al., 2004).

Die Wirkung von Ghrelin auf die Regulation der Insulinsekretion wurde auch *in vivo* untersucht. In gesunden gefasteten Probanden führt die intravenöse Verabreichung von Ghrelin zu einer Senkung des Insulinspiegels und einer gleichzeitigen Erhöhung des Blutzuckerspiegels (Broglia et al., 2001). Ähnlich zu Humanstudien hemmt die

intravenöse Gabe von Ghrelin die fasten- und glukoseinduzierte Insulinsekretion in Mäusen (Reimer et al., 2003). Genetische Manipulationen des Ghrelin-Systems beeinflussen ebenfalls die Glukosehomöostase. Eine Überexpression des Ghrelin-Gens (Ghrl) in transgenen Mäusen senkt den Insulinspiegel, wohingegen eine Inaktivierung von GHS-R oder Ghrelin in GHS-R/Ghrelin Knockout Mäusen eine Verbesserung der Insulinsekretion induziert und die Entwicklung einer Glukoseintoleranz verhindert (Iwakura et al., 2005; Chacko et al., 2012). In adipösen diabetischen ob/ob Mäusen, die aufgrund einer Mutation kein Leptin produzieren, verbessert das Knockout des Ghrl die Insulinsekretion (Sun et al., 2006; Ma et al., 2011). Eine chronische Behandlung mit GHS-R Agonisten induziert Hyperglykämie und Insulinresistenz in gesunden älteren Menschen (Chapman et al., 1996; Svensson et al., 1998; Muller et al., 2001). Im Gegensatz dazu führt eine Blockade des Rezeptors (GHS-R Knockout Mäuse) zu einem Anstieg der Insulinsekretion und einer Normalisierung des Blutzuckerspiegels (Longo et al., 2011).

### **3.4 Strategien und therapeutische Intervention gegen Übergewicht**

Adipositas und sekundäre Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 sind ein gravierendes Gesundheitsproblem und wurden zu einer grossen Herausforderung des Gesundheitssystems im 21. Jahrhundert (Chollet et al., 2009). Das Überangebot von energiereichen Lebensmitteln und eine Abnahme der körperlichen Aktivität haben diese Problematik verstärkt.

Rund 90% der Diabetes mellitus Typ 2 Fälle werden durch Übergewicht induziert; demnach ist Adipositas der primäre Risikofaktor für Diabetes Typ 2 (Gan, 2003). Neue Behandlungen, die direkt die Glukosetoleranz verbessern und gleichzeitig zu einem klinisch bedeutsamen Gewichtsverlust führen, könnten eine wichtige Rolle in der therapeutischen Intervention des Diabetes mellitus Typ 2 spielen.

Bariatrische Eingriffe sind die zur Zeit effektivsten Therapien, die zu einer langfristigen Gewichtsabnahme und zu einer Verbesserung des diabetischen Status bei stark übergewichtigen und diabetischen Menschen führen. Neben dem Roux-en-Y Magen-Bypass besteht die Möglichkeit der sogenannten Vertical Sleeve Gastrektomie oder dem Magenband (Lutz und Bueter, 2014). Es wird angenommen, dass eine Gewichtsabnahme nach Bypass Operation durch eine reduzierte Mahlzeitaufnahme bzw. einem erhöhten Energieumsatz zustande kommt. Allerdings

sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht ausreichend geklärt. Durch eine Veränderung der gastrointestinalen Funktionen kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von Darmhormonen wie CCK, PYY und GLP-1 (Le Roux et al., 2006; Le Roux et al., 2007; Pournaras et al., 2010; Le Roux et al., 2010; Shin et al., 2010). Die Gründe für die unabhängig vom Gewichtsverlust auftretende Verbesserung der Diabetessymptomatik sind ebenfalls nicht restlos geklärt.

Durch die Bedeutung des ARC in Bezug auf die Steuerung und Kontrolle des Körpergewichts, gilt er als Zielstruktur für die Entwicklung von Medikamenten gegen Übergewicht. Aufgrund der Hyperlipidämie und Leptinresistenz bei übergewichtigen Menschen, erwies sich eine Leptinbehandlung bereits kurz nach Entdeckung dieses Hormons als ungeeigneter therapeutischer Ansatz gegen Adipositas (Heymsfield et al., 1999). Leider waren auch viele weitere der bisher erprobten pharmakologischen Strategien nicht effektiv genug oder von gravierenden Nebenwirkungen begleitet. Aufgrund der Effekte von Ghrelin auf die Energiehomöostase und den Glukosestoffwechsel sind Substanzen, die mit dem GHS-R interagieren, ein vielversprechender Therapieansatz gegen Übergewicht und Diabetes Typ 2. Da der Ghrelinspiegel bei übergewichtigen Menschen verringert ist, scheinen GHS-R Antagonisten als Strategie gegen Adipositas nur sehr begrenzt wirksam zu sein (Cummings et al., 2002). Dies bestätigen auch Studien, in denen Ghrelin Antagonisten keine ausreichende Reduktion der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts bei Menschen und Nagern erreichten (Zorrilla et al., 2006). Antagonisten blockieren allgemein die Aktivität von Agonisten (Chollet et al., 2009). Im Gegensatz dazu binden inverse Agonisten an einen spontanaktiven Rezeptor und reduzieren dessen biologische Antwort. Die Aktivität des GHS-R beträgt auch ohne Ligandenbindung ca. 50% der maximal durch Ghrelin oder synthetischen Ghrelin Agonisten stimulierbaren Aktivität (Holst et al., 2003; Holst und Schwartz, 2004). Aufgrund der Hemmung dieser hohen konstitutiven Aktivität des GHS-R bewirken inverse Ghrelin Agonisten unabhängig von Ghrelin eine dem Ghrelin entgegengesetzte Wirkung (Holst et al., 2003; Holst und Schwartz, 2004). Für sie wird daher im Zusammenhang mit Adipositas/Diabetes eine bessere Wirksamkeit als für GHS-R Antagonisten vermutet (Els et al., 2010).

### 3.5 Ziel der Studie

In dieser Arbeit wurden in Kollaboration mit Helsinn Healthcare SA (Lugano, Schweiz) und dem Swiss Institute for Bioinformatics (Lausanne, Schweiz), neu entwickelte, nicht-peptiderge IA getestet. In parallelen elektrophysiologischen Studien (*in vitro*) wurde für diese IA eine dem Ghrelin entgegengesetzte Wirkung auf die neuronale Aktivität im ARC nachgewiesen (unpublizierte Daten). Es war Ziel der vorliegenden Studie zu testen, ob sich auch *in vivo* Korrelate dieser Effekte auf neuronaler Ebene und in Verhaltensstudien mit Mäusen demonstrieren lassen. Hierzu wurden immunhistochemische Versuche sowie Fütterungs- und Aversionsstudien bei Mäusen durchgeführt.

In dieser Studie sollten im Speziellen folgende Fragestellungen geklärt werden:

- **Führt die Gabe der getesteten inversen Ghrelin Agonisten IA1, IA2 und IA3 zu einer reduzierten fasteninduzierten c-Fos Expression im ARC?**

Ziel dieses experimentellen Ansatzes ist ein indirekter Nachweis einer Hemmwirkung der Testsubstanzen auf die Aktivität des ARC. Er basiert auf der Aufhebung oder Abschwächung einer durch Fasten induzierten neuronalen Aktivierung (c-Fos Expression) des ARC (Riediger et al., 2004). Die fasteninduzierte Aktivierung des ARC lässt sich nicht nur durch das Anbieten von Nahrung aufheben (Riediger et al., 2004), sondern wird auch durch exogene Hormone (z.B. PYY und Leptin) (Riediger et al., 2004; Becskei et al., 2010) oder parenteral applizierte Glukose (Becskei et al., 2008) reduziert. Basierend auf der postulierten Hemmwirkung der inversen Agonisten wird daher auch für diese Testsubstanzen eine Abschwächung der fasteninduzierten c-Fos Expression vermutet. Um eine Maskierung dieser Wirkung durch eine eventuell parallel auftretende, indirekt vermittelte neuronale Aktivierung auszuschliessen, wurde ebenfalls untersucht, ob eine Verabreichung der IA in ad libitum gefütterten Mäusen zu einer c-Fos Antwort führt.

- **Führen die inversen Ghrelin Agonisten IA2 und IA3 zu einer reduzierten Futteraufnahme?**

In diesen akuten Fütterungsstudien wurde nach Applikation (s.c. oder p.o.) der inversen Ghrelin Agonisten IA2 und IA3 die Futteraufnahme an mehreren Zeitpunkten innerhalb von 24 Stunden gemessen.

Aufgrund ihrer dem Ghrelin entgegengesetzten Wirkung auf neuronaler Ebene, wird für IA eine anorektische Wirkung vermutet.

- **Kann ein aversiver Effekt des inversen Ghrelin Agonisten IA3 ausgeschlossen werden?**

Nach Applikation der inversen Agonisten wird eine reduzierte Futteraufnahme in Mäusen angenommen. Um auszuschliessen, dass diese Reduktion aufgrund eines aversiven Effekts der Testsubstanz zustande kommt, wurde eine Studie zur konditionierten Geschmacksaversion (CTA, engl. *conditioned taste aversion*) durchgeführt. Das Versuchsdesign wurde bereits in ähnlichen Studien eingesetzt (Song et al., 2013). Es basiert auf der Ausbildung einer konditionierten Aversion gegen eine Saccharinlösung infolge der Verabreichung von Stimuli, welche ein Unwohlsein oder ein Krankheitsgefühl auslösen. Eine derartige Wirkung wird z.B. durch LiCl verursacht, das daher in der vorliegenden Studie als Positivkontrolle verwendet wurde. Eine ausbleibende Entwicklung einer Aversion nach der Verabreichung einer Testsubstanz deutet auf eine nicht aversive Wirkung hin und gilt daher insbesondere bei Untersuchungen zur Nahrungsaufnahme als ein wichtiges Kriterium einer spezifischen Wirkungsweise.

## 4. Materialien und Methoden

### 4.1 Tiere

Für die c-Fos-, Fütterungs- und Aversionsstudien wurden adulte männliche C57BL/6NCrI Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) zwischen 22-33g verwendet. Sie wurden unter konstanten Temperaturbedingungen (22°C) in hängenden Gitterkäfigen in Einzelhaltung bei einem 12:12 Stunden Licht/Dunkelzyklus gehalten. Die Tiere hatten, mit Ausnahme der unten beschrieben speziellen Versuchsbedingungen, freien Zugang zu Futter und Wasser (Standard Nagerfutter; #3430; Kliba Nafag, Kaiseraugst, Schweiz). In Anlehnung an die Studie von Ryabinin et al. (1999) wurden die Tiere vor Versuchsbeginn 3 Wochen an die experimentellen Bedingungen adaptiert, um stressbedingte Effekte (z.B. auf die c-Fos Expression) zu minimieren. Zudem wurde den Mäusen davor eine Woche Zeit zur Adaption an Raum und Umfeld gegeben.

Alle Experimente wurden vom Kantonalen Veterinäramt Zürich genehmigt.

### 4.2 C-Fos Studien

#### 4.2.1 Injektion und Perfusion

Für die c-Fos Studien wurde ein Teil der Mäuse während der Lichtphase für 12 Stunden gefastet. Zu Beginn der Dunkelphase wurden entsprechend der Gruppe der inverse Ghrelin Agonist IA1 (10mg/kg; s.c.), IA2 (10mg/kg; s.c.) bzw. IA3 (60mg/kg; p.o.), welche von Helsinn Healthcare SA zur Verfügung gestellt wurden, oder das reine Lösungsmittel (DMAC 10%/ Solutol 6%/ PBS 84%; 10ml/kg s.c. bzw. 0,5%ige Methylzellulose; 0,3ml p.o.) als Kontrolle appliziert. Zwei Stunden nach Applikation wurden die Tiere perfundiert. Mittels Pentobarbital (200mg/kg; i.p) wurden die Mäuse in tiefe Anästhesie versetzt.

Für die Perfusion wurden die Tiere in Rückenlage fixiert. Nach Erreichen der nötigen Narkosetiefe (Wegfall der nozizeptiven Reflexe) wurde zunächst der Thorax eröffnet. Hierfür wurde die Haut über dem Sternum und Thorax mit einer Schere bis cranial auf die Höhe der Schulterblätter entfernt. Anschliessend wurde der Brustraum vom Xiphoid eröffnet und das Diaphragma vorsichtig entlang des Rippenbogens durchtrennt, um das Herz zugänglich zu machen. Mit einer Schere wurden danach



die Rippen durchtrennt, sodass das Sternum nach rostral geklappt und mit einer Klemme fixiert werden konnte. Das freiliegende Herz wurde vom Perikard befreit. Im Anschluss daran wurde eine 26G Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt und das rechte Atrium mit einer kleinen spitzen Schere durch einen Schnitt eröffnet. Danach wurden die Mäuse transkardial zunächst mittels 4°C gekühltem Phosphatpuffer (PB) (0,1M Lösung; pH 7,4) für 90 Sekunden entblutet und anschliessend mit einer ebenfalls gekühlten Paraformaldehydlösung (PFA) (PFA 4% in PB; pH 7,2) für zwei Minuten fixiert.

Für die Gehirnentnahme wurde zunächst die Haut von der Nase ausgehend bis nach caudal zwischen die Schulterblätter mit dem Skalpell durchtrennt. Um das Gehirn freizulegen wurden danach sämtliche Muskeln und Faszien freipräpariert und vorsichtig mittels Knochenzange die Schädeldecke entfernt. Mit einem Querschnitt durch Bulbus olfactorius und durch Medulla oblongata wurde das Gehirn abgetrennt und mittels Spatel aus der Schädelhöhle gelöst.

Nach Entnahme der Gehirne wurden diese in 4%iger PFA Lösung über Nacht für etwa 24 Stunden bei 4°C nachfixiert und danach zur Kryoprotektion für weitere 24 Stunden in 20%iger Sucroslösung in PB (0,1M) bei 4°C gelagert.

**Tab. 1:** Phosphatpuffer 0,1M

Stock Lösung	Substanz	Konzentration (g/l)	Endkonzentration (M)
1	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	27,8	0,2
2	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	35,6	0,2
228ml von Stock 1 + 972ml Stock 2 mischen; 600ml von Stock 1+2 + 600ml destilliertes Wasser; Endvolumen 1200ml; Endkonzentration 0,1M; kühlen auf 4°C, pH Wert auf 7,4			

**Tab. 2:** PFA-Lösung 4%

Substanz	Menge
PFA (g)	48
dH <sub>2</sub> O (ml)	600
NaOH (1M)	4 Tropfen
0,2M PB (ml)	600
600ml 0,2M PB + 600ml destilliertes Wasser auf beheiztem Magnetfeld unter Zugabe von 48g PFA und 4 Tropfen NaOH; Endvolumen 1200ml; Endkonzentration 4%; kühlen auf 4°C; pH Wert auf 7,2	

#### 4.2.2 Gehirnschnitte

Nach erfolgter Kryoprotektion wurden die Gehirne vier Minuten in Hexan gefroren, welches zuvor auf -20°C abgekühlt und auf Trockeneis platziert wurde.

Mit einem Gefriermikrotom (Leica CM 3050 S, Leica Microsystems) wurden 20µm dicke Gehirnschnitte bei etwa -21°C angefertigt. Zwei alternierende Schnittserien wurden in der Region des Nucleus arcuatus mit adhäsiven Glasobjektträgern (Menzel-Gläser Superfrost® Plus, Gerhard Menzel GmbH) aufgenommen. Anschliessend wurden die Schnitte durch Auflegen eines Fingers auf der Rückseite der Objektträger aufgetaut, um sie auf diesen zu fixieren. Bis zur weiteren immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte bei -20°C gelagert.

#### 4.2.3 Immunhistologische c-Fos Detektion

Die Schnitte wurden zunächst bei Raumtemperatur für 1h aufgetaut und getrocknet. Anschliessend wurden sie zweimal für 5min in 0,1%iger PBST-Lösung (0,1ml Triton® in 100ml PBS) rehydriert und permeabilisiert.

Um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurden die Schnitte für 2h in einer Blockade-Lösung (8ml PBST 0,3% + 150µl Normal Goat Serum (NGS) + 2ml Avidin) inkubiert und danach erneut dreimal für 10min in 0,1%iger PBST-Lösung gewaschen. Die Schnitte wurden dann für ca. 48h bei 4°C mit dem primären Antikörper (rabbit anti c-fos Ab-5, Merck Millipore, 1:10.000; 8ml PBST 0,3% + 2ml Biotin + 1µl Antikörper) inkubiert. Danach wurden sie fünfmal für 10min in 0,1%iger PBST-Lösung gewaschen und für 90min mit dem sekundären Antikörper (goat anti-rabbit BA-1000, Vector Laboratories, 1:400; 10ml PBST 0,3% + 150µl NGS + 25µl Antikörper) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10min in 0,1%iger PBST-Lösung erfolgte eine Inkubation in einem Avidin-Biotin Komplex (nach Herstellerangaben, Vectastain ABC Kit PK-6100®, Vector Laboratories) für 1h. Daraufhin wurden die Schnitte für 10min in 0,1%iger PBST-Lösung und in 0,05M TrisHCl gewaschen.

Zur Detektion des sekundären Antikörpers wurden die Schnitte im Dunkeln für etwa 4-5min in einer Diaminobenzidin (DAB)-Lösung (Sigma Aldrich, 3,3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate; PBS + 0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 0,08% NiCl + 0,01% CoCl) inkubiert und anschliessend in einem letzten Waschschriff dreimal für 5min gewaschen. Danach wurden die Schnitte jeweils für 5min in einer Alkoholreihe (50%, 75%, 95%, 100% Ethanol und 100% Xylol) entwässert. Die Schnitte wurden getrocknet und danach mit Entellan® bedeckt.

Da der oben beschriebene Primärantikörper für einen Teil der Versuche nicht mehr verfügbar war, wurde analog zu diesem Protokoll ein Teil der Schnitte mit alternativen Antikörpern gefärbt. Anstatt von NGS wurde Normal Donkey Serum (NDS) verwendet. Als Primärantikörper wurde goat anti-c-fos Antikörper (Sc-52-G, Santa Cruz Biotechnology Inc., 1:500 in PBST) benutzt. Dieser wurde mit dem sekundären Antikörper biotinylated horse anti-goat (BA-9500, Vector Laboratories, 1:400) durch DAB-Färbung nachgewiesen.

**Tab. 3:** Verwendete Antikörper für die Immunhistochemische Färbung

Primärantikörper			Sekundärantikörper		
Antikörper	Anbieter	Konzentration	Antikörper	Anbieter	Konzentration
Rabbit anti-c-fos	Ab-5 Merck Millipore	1:10.000	Biotinylated goat anti-rabbit	BA-1000 Vector Laboratories	1:400
Goat anti-c-fos	Sc-52-G Santa Cruz Biotechnology Inc.	1:500	Biotinylated horse anti-goat	BA-9500 Vector Laboratories	1:1.000

**Tab. 4:** PBS

Substanz	Gewicht (g)
NaCl	8
KCl	0,2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2
Gelöst in 1l destilliertem Wasser	

#### 4.2.4 Quantifizierung und statistische Auswertung

Um die c-Fos Expression im ARC der Tiere zu quantifizieren, wurden die c-Fos positiven und dunkelblaugefärbten Zellkerne in drei bis fünf Schnitten pro Objektträger unter dem Lichtmikroskop (Axio Imager Z2, Carl Zeiss Microscopy) ausgezählt und anschliessend der Mittelwert gebildet. Aus diesen Werten wurden danach die Mittelwerte für die Behandlungsgruppen berechnet (n = Anzahl der Tiere). Das Auszählen der Schnitte erfolgte ohne Kenntnis der Zugehörigkeit zu den

jeweiligen Gruppen. Zur Dokumentation wurden nach Auswertung aller Schnitte von jeder Versuchsgruppe Digitalaufnahmen gemacht.

Alle Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Statistikprogramm Prism 5.0 für Mac unter Anwendung des t-tests (bei zwei Gruppen) und der one-way ANOVA (bei mehr als zwei Gruppen) und anschliessendem Newman-Keuls Multiple Comparison Test ausgewertet und grafisch dargestellt. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

### **4.3 Fütterungsstudien**

#### 4.3.1 Vorbereitung

Die Tiere wurden zunächst eine Woche an die Haltungsbedingungen adaptiert. Während dieser Zeit wurde die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht (Baseline Wert) täglich gemessen. Hierfür wurde das Futter samt Trog entfernt und die sich unter den Käfigen befindende Einstreu mit Küchenpapier ausgetauscht. Den Mäusen standen täglich vier neue, einzelne Futterpellets zur Verfügung, deren Ausgangsgewicht vor der Gabe bestimmt wurde. Das Endgewicht der Pellets (unter Berücksichtigung des verstreuten Futters unter den Käfigen) wurde nach 24 Stunden gemessen und die gesamte Futteraufnahme dokumentiert.

#### 4.3.2 Versuchsdurchführung

Am Tag 1 wurde den Mäusen für die letzten 3 Stunden der Lichtphase das Futter entzogen, um eine kurzfristige ungleichmässige Nahrungsaufnahme vor Versuchsbeginn zu verhindern und somit für alle Tiere dieselbe Ausgangslage für das Experiment zu schaffen. Kurz vor Beginn der Dunkelphase wurde den Mäusen entsprechend ihrer Gruppe entweder der inverse Ghrelin Agonist IA2 (10mg/kg; s.c.), bzw. IA3 (60mg/kg; p.o. bzw. 30mg/kg; s.c.) oder das reine Lösungsmittel (DMAC 10%/ Solutol 6%/ PBS 84%; 10ml/kg s.c.; bzw. 0,5%ige Methylzellulose; 0,3ml p.o.) appliziert. Zu Beginn der Dunkelphase wurden je 4 gewogene Futterpellets in den Käfigen platziert. Diese Futtermenge war ausreichend um eine ad libitum Fütterung über 24 Stunden zu gewährleisten. Die Futterpellets wurden dann an mehreren Zeitpunkten während der folgenden 24 Stunden gewogen, um den Zeitverlauf der Nahrungsaufnahme zu bestimmen.

Nach zwei Tagen Pause wurde am Tag 4 der Versuch unter identischen Bedingungen wiederholt durchgeführt, wobei jene Tiere, die an Tag 1 zuerst den inversen Ghrelin Agonisten bekommen hatten, nun das Lösungsmittel erhielten und umgekehrt (engl. *cross over*). Auf ein *cross over* wurde verzichtet, wenn bereits nach dem ersten Versuchsdurchgang signifikante Resultate vorlagen.

#### 4.3.3 Statistische Auswertung

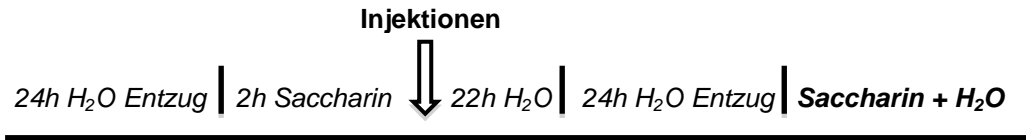
Alle Futteraufnahmen werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Mittels Prism 5.0 für Mac wurde ein gepaarter t-test durchgeführt um die Auswirkung der Behandlungen zwischen den Tieren zu vergleichen. Für die Versuche ohne *cross over* wurde ein ungepaarter t-test durchgeführt. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

### **4.4 Aversionsstudie**

#### 4.4.1 Konditionierte Geschmacksaversion mit Saccharin

Die Mäuse (n=24) wurden zunächst fünf Tage lang an die Trinkflaschen adaptiert und die tägliche Wasseraufnahme wurde protokolliert. Die Tiere hatten dabei immer freien Zugang zu Futter.

Für den Versuch wurde den Tieren zunächst für 24h das Trinkwasser entzogen. Am Anfang der Dunkelphase wurde anschliessend eine Saccharinlösung (0,15%) für 2h auf der gegenüberliegenden Seite der Wasserflasche angeboten. Danach wurde den Mäusen entsprechend ihrer Versuchsgruppe der inverse Ghrelin Agonist IA3 (30mg/kg; s.c.), das reine Lösungsmittel (10ml/kg; s.c.; DMAC 10%/ Solutol 6%/ PBS 84%) oder LiCl (0,15M; 10ml/kg; i.p.) injiziert. Die Saccharinflaschen wurden dann durch Wasserflaschen ausgetauscht. Am darauffolgenden Tag wurde erneut ein Wasserentzug (24h) durchgeführt und danach sowohl Wasser als auch eine Saccharinlösung angeboten. Die jeweilige Flüssigkeitsaufnahme wurde nach 4 und 24h dokumentiert.



**Abb. 1:** Versuchsdesign zur konditionierten Geschmacksaversion

#### 4.4.2 Statistische Auswertung

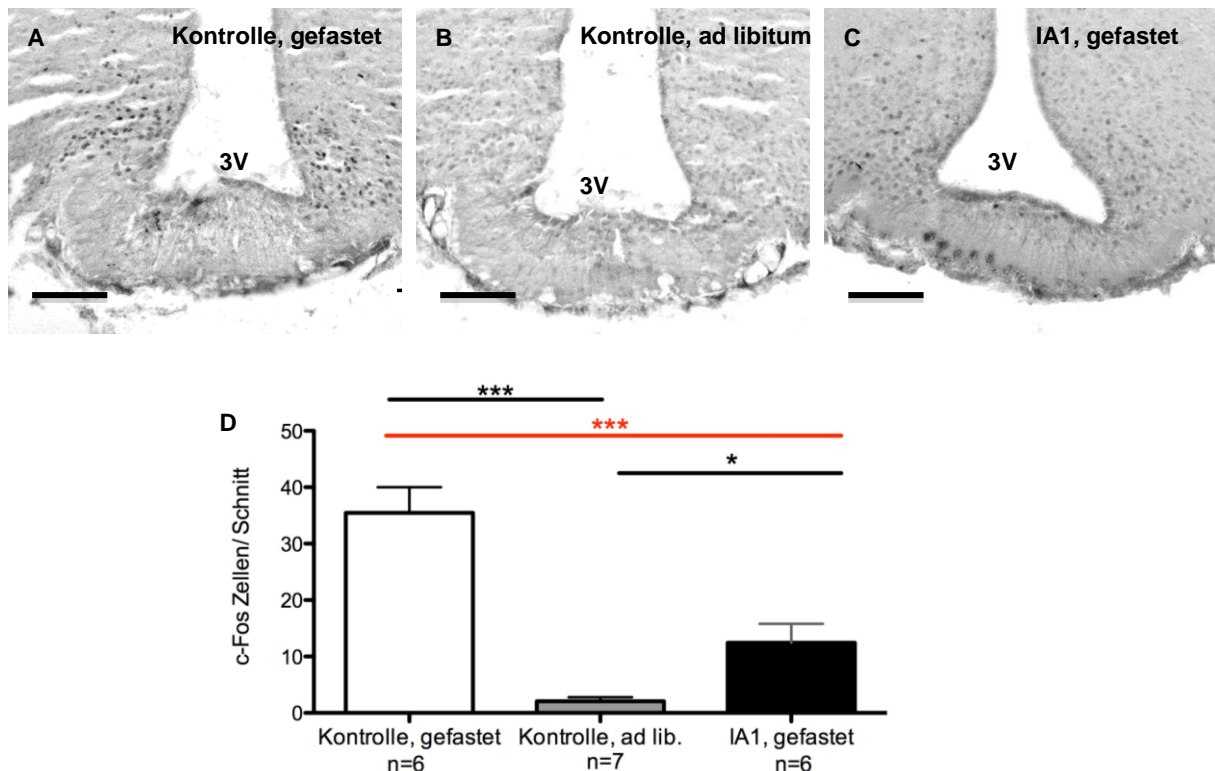
Die Daten wurden mittels Prism 5.0 für Mac ausgewertet. Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurde eine nicht parametrische one-way ANOVA und ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt, um die Auswirkung der Behandlungen zwischen den Tieren zu vergleichen. Alle Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 c-Fos Studien

#### 5.1.1 Einfluss des inversen Ghrelin Agonisten IA1 auf die fasteninduzierte c-Fos Expression

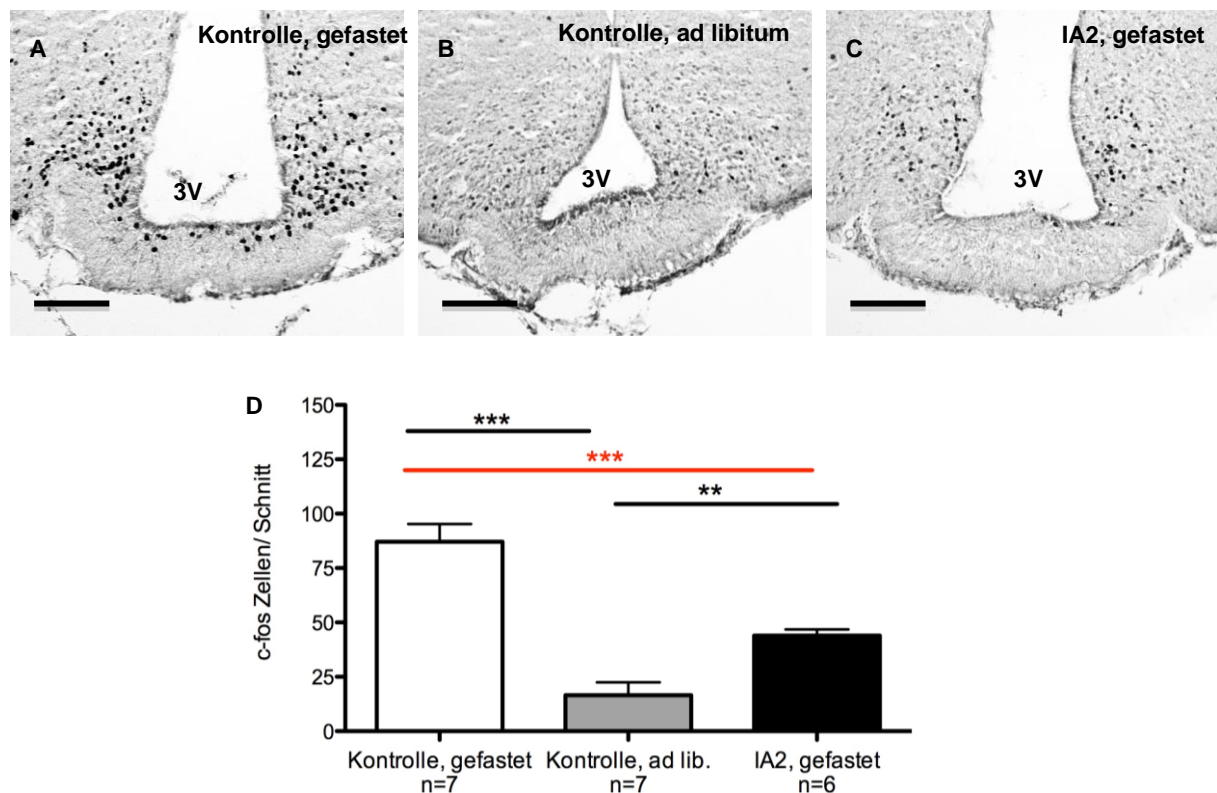
Futterentzug induzierte eine starke c-Fos Expression im ARC der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu waren kaum c-Fos positive Neurone in ad libitum gefütterten Kontrolltieren nachweisbar. Die Behandlung von gefasteten Tieren mit IA1 (10mg/kg; s.c.) reduzierte signifikant die c-Fos Expression im ARC um 64% im Vergleich zur gefasteten Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 2:** IA1 (10mg/kg, s.c.) reduziert die fasteninduzierte c-Fos Expression im ARC. Repräsentative Schnitte in der Region des ARC. **A** 12h gefastete Mäuse nach Lösungsmittelgabe, **B** ad libitum gefütterte Mäuse nach Lösungsmittelgabe, **C** 12h gefastete Mäuse nach IA1 Gabe. **D** Quantifizierung der Anzahl der c-Fos positiven Neurone im ARC der unterschiedlich behandelten Gruppen. 3V: 3. Ventrikel. Massstab 100µm. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$ .

### 5.1.2 Einfluss des inversen Ghrelin Agonisten IA2 auf die fasteninduzierte c-Fos Expression

Die gefastete Kontrollgruppe (n=7) zeigte eine deutliche c-Fos Expression, wohingegen bei den ad libitum gefütterten Tieren kaum c-Fos positive Neurone vorzufinden waren. Die Applikation von IA2 (10mg/kg; s.c.) reduzierte die c-Fos Expression signifikant um 49,4% verglichen mit der gefasteten Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ).



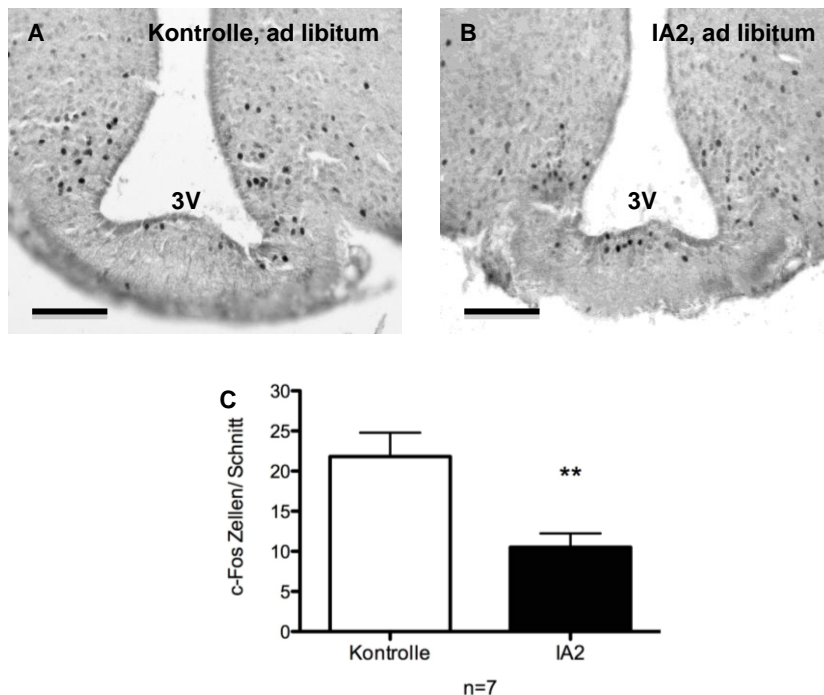
**Abb. 3:** IA2 (10mg/kg, s.c.) reduziert die fasteninduzierte c-Fos Expression im ARC. Repräsentative Schnitte in der Region des ARC. **A** 12h gefastete Mäuse nach Lösungsmittelgabe, **B** ad libitum gefütterte Mäuse nach Lösungsmittelgabe, **C** 12h gefastete Mäuse nach IA2 Gabe. **D** Quantifizierung der Anzahl der c-Fos positiven Neurone im ARC der unterschiedlich behandelten Gruppen. 3V: 3. Ventrikel. Massstab 100µm. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Die bisherigen Versuche wiesen darauf hin, dass die IA zu einer Reduktion der fasteninduzierten c-Fos Expression im ARC führen. Um dies abzusichern und um auszuschliessen, dass IA2 per se zu einer neuronalen Aktivierung im ARC führt,



wurde ebenfalls untersucht, ob eine Verabreichung von IA2 in ad libitum gefütterten Mäusen zu einer c-Fos Antwort führt.

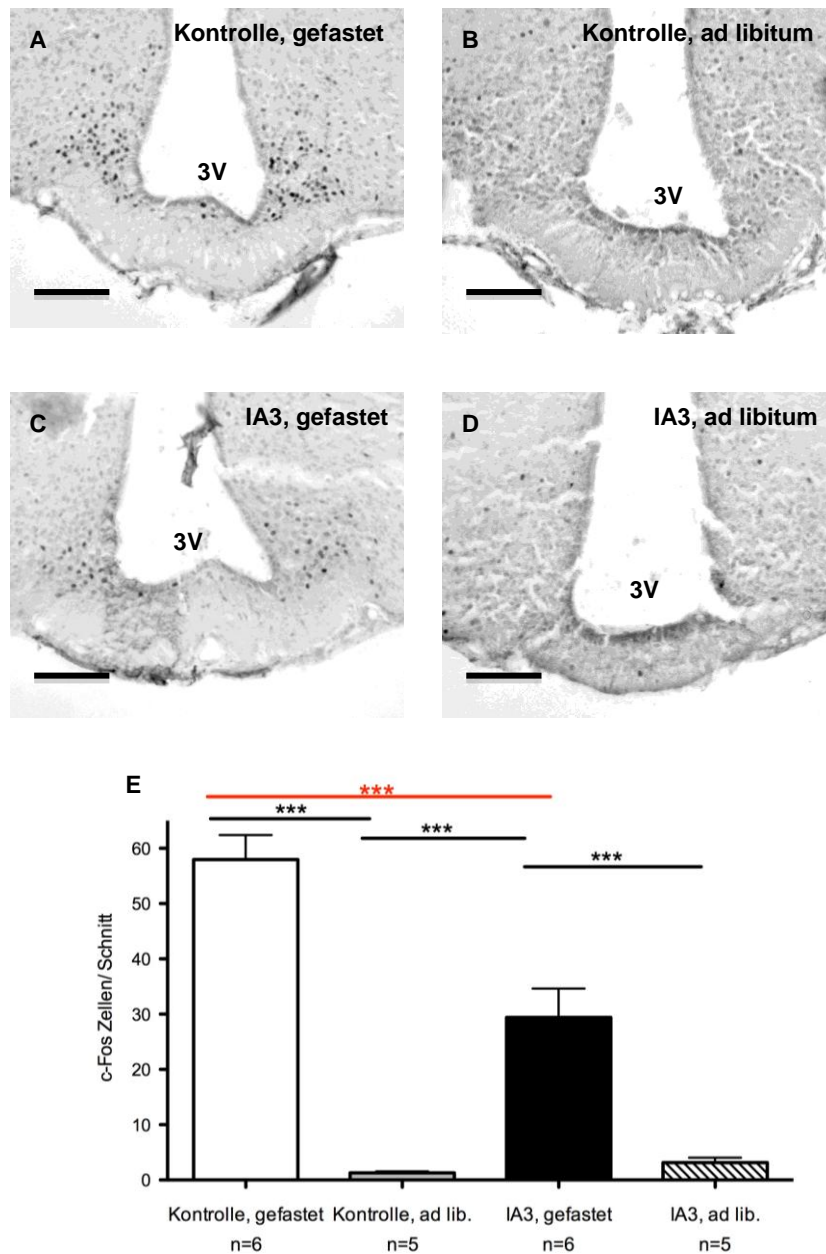
In Antwort auf IA2 wurde die c-Fos Expression signifikant um 50% ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert.



**Abb. 4:** IA2 (10mg/kg, s.c.) reduziert die c-Fos Expression im ARC im Vergleich zur Kontrollgruppe in ad libitum gefütterten Mäusen. Repräsentative Schnitte in der Region des ARC von ad libitum gefütterten Mäusen. **A** nach Lösungsmittelgabe, **B** nach IA2 Gabe. **C** Quantifizierung der Anzahl der c-Fos positiven Neurone im ARC der unterschiedlich behandelten Gruppen. 3V: 3. Ventrikel. Massstab 100 $\mu$ m. \*\*  $p < 0,01$ .

### 5.1.3 Einfluss des inversen Ghrelin Agonisten IA3 auf die fasteninduzierte c-Fos Expression

Der inverse Ghrelin Agonist IA3 (60mg/kg) wurde für diesen Versuch oral appliziert. Die gefastete Kontrollgruppe zeigte eine starke c-Fos Expression im ARC, während die ad libitum gefütterte Kontrollgruppe kaum c-Fos positive Neurone aufwies. Die Gabe von IA3 reduzierte im Vergleich zur gefasteten Kontrollgruppe die c-Fos Expression im ARC signifikant um 50% ( $p < 0,001$ ). In ad libitum gefütterten Tieren induzierte IA3 keine stärkere c-Fos Expression verglichen mit der ad libitum gefütterten Kontrollgruppe.

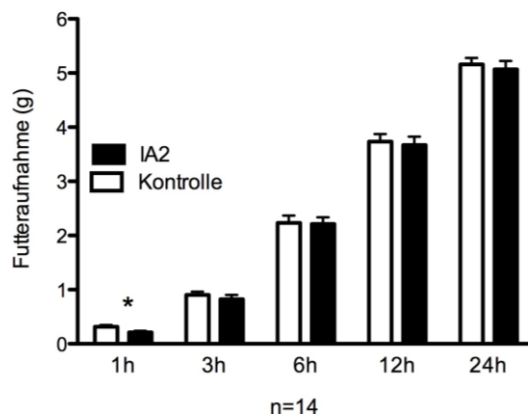


**Abb. 5:** IA3 (60mg/kg, p.o.) reduziert die fasteninduzierte c-Fos Expression im ARC. Repräsentative Schnitte in der Region des ARC. **A** 12h gefastete Mäuse nach Lösungsmittelgabe, **B** ad libitum gefütterte Mäuse nach Lösungsmittelgabe, **C** 12h gefastete Mäuse nach IA3 Gabe, **D** ad libitum gefütterte Mäuse nach IA3 Gabe. **E** Quantifizierung der Anzahl der c-Fos positiven Neurone im ARC der unterschiedlich behandelten Gruppen. 3V: 3. Ventrikel. Massstab 100µm. \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 5.2 Fütterungsstudien

### 5.2.1 Einfluss von IA2 auf die Futteraufnahme nach subkutaner Injektion

Die Futteraufnahme nach einer Stunde wurde durch den inversen Ghrelin Agonisten IA2 (10mg/kg; s.c.) signifikant um 34% reduziert ( $p < 0,05$ ). Nach einer Stunde lag die Nahrungsaufnahme in der Kontrollgruppe im Mittel bei 0,32g ( $\pm 0,03$ g;  $n=14$ ), diejenige der IA2 injizierten Tiere bei 0,21g ( $\pm 0,03$ g). Für die weiteren Zeitpunkte nach 3, 6, 12 und 24 Stunden wurde keine statistische Signifikanz festgestellt.

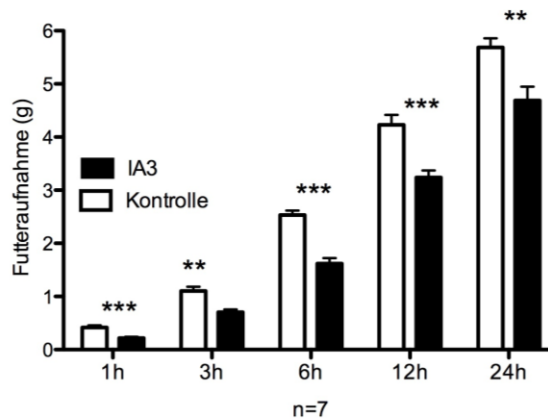


**Abb. 6:** IA2 (10mg/kg, s.c.) reduziert die Futteraufnahme von Mäusen nach 1h ( $n=14$ ; cross over Design) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Gepaarter t-test. \*  $p < 0,05$ .

### 5.2.2 Einfluss von IA3 auf die Futteraufnahme nach subkutaner Injektion

Der inverse Ghrelin Agonist IA3 (30mg/kg) reduzierte nach subkutaner Injektion die Futteraufnahme; diese war zu allen Messzeitpunkten über 24 Stunden signifikant gegenüber der Kontrollgruppe verringert.

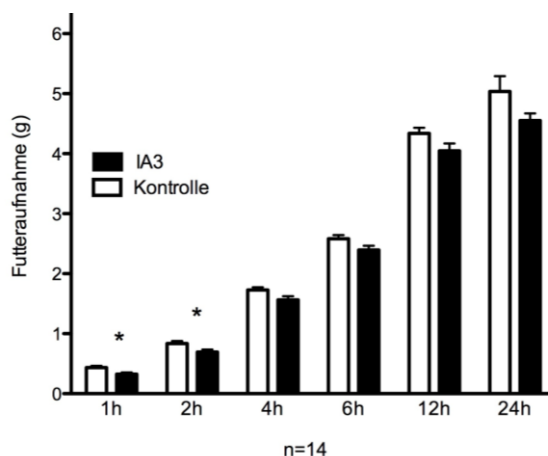
Die Nahrungsaufnahme in den Kontrolltieren ( $n=14$ ; Lösungsmittel) betrug zwischen 0,42g  $\pm$  0,04g nach einer Stunde und 5,7g  $\pm$  0,17g nach 24 Stunden. In Antwort auf IA3 wurde die Futteraufnahme zwischen 48% (0,22g  $\pm$  0,02g) nach 1 Stunde und 18% (4,7g  $\pm$  0,26g) nach 24 Stunden reduziert.



**Abb. 7:** IA3 (30mg/kg, s.c.) reduziert die Futteraufnahme von Mäusen zu allen Messzeitpunkten über 24h (n=7). Ungepaarter t-test. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ .

### 5.2.3 Einfluss von IA3 auf die Futteraufnahme nach oraler Applikation

Die Kontrolltiere zeigten im Mittel eine Nahrungsaufnahme von  $0,43g \pm 0,03g$  nach einer Stunde und  $0,84g \pm 0,04g$  nach zwei Stunden. Der inverse Ghrelin Agonist IA3 (60mg/kg) reduzierte die Futteraufnahme statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) um 26% ( $0,32g \pm 0,03g$ ) nach einer Stunde und um 18% ( $0,69g \pm 0,04g$ ) nach zwei Stunden. Für die weiteren Messzeitpunkte war die Reduktion der Nahrungsaufnahme nicht signifikant.



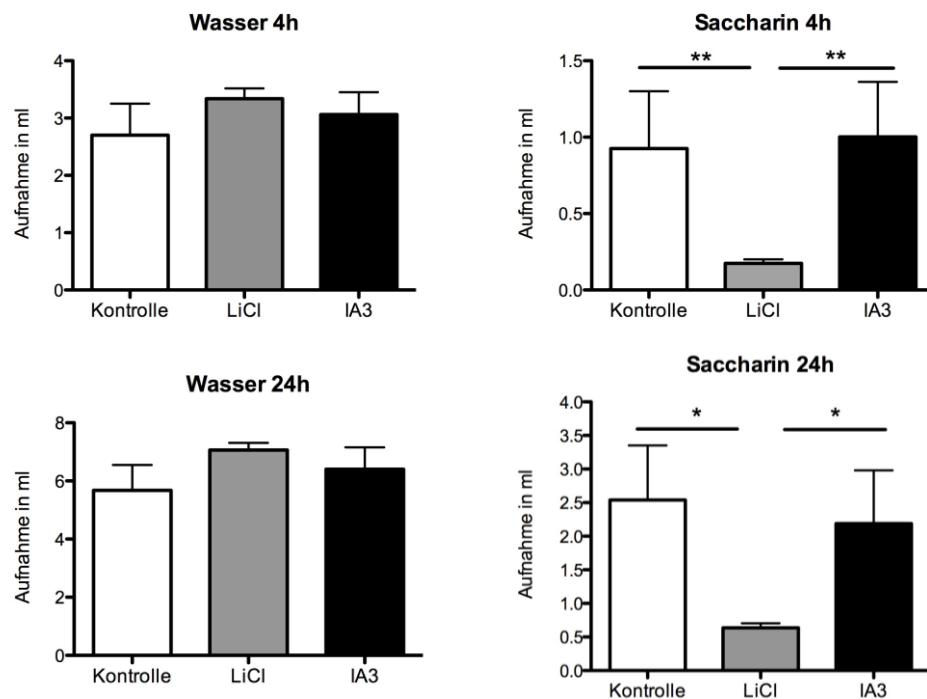
**Abb. 8:** IA3 (60mg/kg, p.o.) reduziert die Futteraufnahme von Mäusen nach 1h und 2h (n=14, cross over Design). Gepaarter t-test. \*  $p < 0,05$ .

### 5.3 Aversionsstudie

#### 5.3.1 Einfluss von IA3 auf die Auslösung einer Geschmacksaversion

Die Kontroll- und IA3 Gruppe (30mg/kg; s.c.) tranken durchschnittlich 1ml Saccharin nach einer Stunde. Im Gegensatz dazu betrug die Saccharinaufnahme in der Positivkontrollgruppe nur ca. 0,2ml. Der Unterschied in der Saccharinaufnahme von der Kontroll- und IA3 Gruppe im Vergleich zur Positivkontrollgruppe war statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ).

Nach 24 Stunden betrug die durchschnittliche Saccharinaufnahme der Kontroll- und IA3 Gruppe zwischen 2,2-2,5ml. LiCl reduzierte die Saccharinaufnahme nach diesem Zeitraum um 74% im Vergleich zu Kontroll- und IA3 Gruppe ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 9:** CTA Test nach IA3 (30mg/kg, s.c.) Gabe in Mäusen (n=8). Quantifizierung der Wasser und Saccharinaufnahme nach 4h und 24h nach voriger Konditionierung mit Saccharin. \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

## 6. Diskussion

In dieser Studie reduzierte die Gabe von inversen Ghrelin Agonisten die fasteninduzierte c-Fos Expression im ARC von Mäusen. Es wurde somit eine hemmende Wirkung der Substanzen durch *in vivo* Studien bestätigt. Zudem reduzierte die IA Applikation in akuten Fütterungsstudien die Futteraufnahme im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. In einer Aversionsstudie wurden keine Hinweise für eine aversive Wirkung dieser IA gefunden.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die bereits *in vitro* demonstrierte hemmende Wirkung der getesteten IA auf die neuronale Aktivität im ARC *in vivo* zu bestätigen. Die Experimente wurden bei Mäusen durchgeführt, die c-Fos im ARC nach Futterentzug exprimieren, wohingegen bei ad libitum Fütterung nur eine minimale Aktivierung auftritt (Mistry et al., 1994; Wang et al., 1998; Morikawa et al., 2004).

In dieser Arbeit reduzierten die inversen Ghrelin Agonisten IA1, IA2 und IA3 signifikant die fasteninduzierte c-Fos Expression im ARC im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach Applikation der inversen Agonisten wurde eine Verminderung der Zahl der c-Fos positiven Zellen um 49-64% beobachtet. Es kam also im Unterschied zu einer durch *Refeeding* induzierten Hemmung der c-Fos Antwort (Becskei et al., 2008; Becskei et al., 2009a) nicht zu einer vollständigen Aufhebung der fasteninduzierten c-Fos Expression. Inwieweit höhere Dosierungen gegebenenfalls zu einer stärkeren Abschwächung der fasteninduzierten c-Fos Antwort geführt hätten, ist offen. Aufgrund der pharmakokinetischen Profile der getesteten Substanzen (unpublizierte Daten), kommen als limitierende Faktoren die unspezifische Bindung an Plasmaproteine, die Blut-Hirn-Schrankengängigkeit und nach oraler Verabreichung die gastrointestinale Absorption bzw. Bioverfügbarkeit in Frage.

Die Aufhebung der fasteninduzierten c-fos Antwort durch die getesteten inversen Agonisten ist vergleichbar mit der Stärke der Hemmwirkung von hormonellen und metabolischen Stimuli, die in früheren Studien unter ähnlichen Versuchsbedingungen getestet wurden. So führten die Behandlungen mit PYY, Leptin oder eine intraperitoneale Verabreichung von Glukose zu einer Abschwächung der fasteninduzierten c-Fos Expression von 60-70% bezogen auf die jeweilige Anzahl an c-Fos positiven Zellen im ARC von gefasteten Kontrolltieren (Riediger et al., 2004; Becskei et al., 2008; Becskei et al., 2009b). Obwohl in keiner der genannten Studien

Dosis-Wirkungsbeziehungen getestet wurden, lassen diese Befunde darauf schliessen, dass offensichtlich eine Interaktion mehrerer Stimuli erforderlich ist, um eine vollständige Hemmung der fasteninduzierten c-Fos Expression im ARC zu bewirken. Ein solches Zusammenspiel von verschiedenen hormonellen und metabolischen Faktoren tritt vermutlich infolge der Nahrungsaufnahme auf und ist eine mögliche Erklärung für die stärkere Abschwächung der ARC Aktivierung nach einem *Refeeding* (Becskei et al., 2008; Becskei et al., 2009a).

Aus Phänotypisierungsstudien lassen sich Rückschlüsse über den Anteil der Neurone im ARC ziehen, die durch Fasten aktiviert werden und den GHS-R exprimieren. Zwischen 90-94% der nach Futterentzug c-Fos positiven Neurone im ARC exprimieren NPY (Wang et al., 2002; Coppola et al., 2007; Becskei et al., 2009a). In 94% aller NPY exprimierenden ARC Neuronen ist der GHS-R vorhanden (Wang et al., 2002). Obwohl damit der überwiegende Teil der durch Fasten aktivierten Zellen den GHS-R besitzen, scheint es einen Anteil von Neuronen zu geben, die aufgrund fehlender GHS-R Expression insensitive gegenüber Ghrelin und IA sind. Neben den zuvor genannten Aspekten könnte auch dies ein Grund für eine nicht vollständige Aufhebung der fasteninduzierten ARC Aktivierung sein.

Eine Maskierung des hemmenden Effekts der getesteten IA durch eine eventuell parallel auftretende Aktivierung anderer Neuronen des ARC (z.B. durch Wegfall einer Inhibition auf POMC Neuronen) kann aufgrund der Befunde in den ad libitum gefütterten Tieren weitestgehend ausgeschlossen werden. Unter diesen Bedingungen gab es keine Hinweise auf eine IA vermittelte Stimulation der c-Fos Expression. IA2 bewirkte sogar unter ad libitum Bedingungen eine weitere Reduktion der basalen c-Fos Expression um etwa 50%. Dies deutet darauf hin, dass inverse Ghrelin Agonisten auch bei ad libitum Fütterung zu einer Hemmung der neuronalen Aktivierung führen. Obwohl eine indirekte Disinhibition von POMC Neuronen aufgrund einer IA vermittelten Hemmung von NPY Neuronen möglich erscheint (Cowley et al., 2001; Riediger et al., 2003), gaben die immunhistologischen Versuche dieser Studie keinen Hinweis auf einen solchen Effekt. Die Negativbefunde in ad libitum gefütterten Tieren sind konsistent mit parallel durchgeführten elektrophysiologischen Versuchen (unpublizierte Befunde), in denen keine erregenden Effekte nach Stimulation mit den untersuchten IA beobachtet wurden. Eine solche theoretisch mögliche, partielle exzitatorische Wirkung der getesteten IA

dürfte sich also nicht einschränkend auf die Interpretation der Resultate der vorliegenden Studien auswirken.

Analoge Studien, die den *in vivo* Effekt von inversen Ghrelin Agonisten auf die neuronale Aktivität untersuchten, sind bislang nicht publiziert. In einer methodisch ähnlichen immunhistologischen Studie (Becskei et al., 2008) wurde der Effekt eines Ghrelin inaktivierenden RNA Moleküls (Spiegelmer NOX-B11; Ghrelin Antagonist) auf die fasteninduzierte c-Fos Expression im ARC untersucht. Während NOX-B11 die durch exogenes Ghrelin vermittelte c-Fos Antwort blockierte, hatte es keinen Effekt auf die ARC Aktivierung nach Futterentzug, für die also endogenes Ghrelin nicht erforderlich zu sein scheint (Becskei et al., 2008). Zusammen mit den vorliegenden Positivbefunden stehen diese Studien in Einklang mit dem dieser Arbeit zu Grunde liegenden Konzept, wonach die untersuchten IA auch unabhängig von Ghrelin eine Hemmwirkung auf ARC Neurone ausüben.

In akuten Fütterungsstudien wurde untersucht, inwieweit sich die neuronalen Effekte der IA auf die Nahrungsaufnahme bestätigen lassen. Aufgrund der im Vergleich zu IA1 länger wirksamen pharmakokinetischen Eigenschaften (unpublizierte Daten) wurden nur IA2 (10mg/kg; s.c.) und IA3 (30mg/kg; s.c. und 60mg/kg; p.o.) getestet. Beide IA reduzierten die Futteraufnahme, wobei die Stärke der Reduktion je nach Substanz und Applikationsart unterschiedlich war. In Einklang mit den c-Fos Studien bewirkte IA2 eine Verminderung der Futteraufnahme nach einer Stunde. Allerdings war die Wirkungsdauer auf diesen Zeitraum beschränkt, weshalb die Dosis bei dem Versuch mit IA3 auf 30mg/kg (s.c.) erhöht wurde. Diese Dosierung war ausreichend um die Nahrungsaufnahme über einen Zeitraum von 24 Stunden signifikant zu reduzieren. Obwohl IA3 auch nach oraler Verabreichung die Nahrungsaufnahme verminderte, war dieser Effekt, trotz der im Vergleich zur subkutanen Injektion doppelten Dosis, nur bis zum Zeitpunkt von zwei Stunden signifikant. Wenn auch für einen direkten Vergleich der Dosis-Wirkungsbeziehungen weitere Studien notwendig sind, scheint eine orale Verabreichung von IA3 weniger effektiv als eine subkutane Injektion zu sein. Dies ist im Einklang mit den pharmakokinetischen Eigenschaften von IA3, da peroral verabreichter IA3 aufgrund einer eingeschränkten gastrointestinalen Absorption zu geringeren Plasmaspiegeln als nach parenteraler Verabreichung führt (unpublizierte Befunde). Allgemein stellt die Bioverfügbarkeit



nach oraler Applikation eine Herausforderung für die Weiterentwicklung der getesteten IA dar.

Es war nicht das Ziel der vorliegenden Studie, eine Analyse des Mahlzeitenmusters durchzuführen. Generell können Änderungen der Nahrungsaufnahme auf einer veränderten Mahlzeitengrösse oder Mahlzeitenfrequenz beruhen. Es können jedoch auch beide Parameter variieren, wobei Veränderungen der Mahlzeitengrösse durch Änderungen der Mahlzeitenfrequenz kompensiert werden können und umgekehrt. Ghrelin wird aufgrund seines Sekretionsmusters (Anstieg vor den Mahlzeiten) eine Rolle bei der Initiierung von Mahlzeiten zugeschrieben. Die Effekte von Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme lassen sich jedoch nicht auf eine Wirkung bezüglich Mahlzeitengrösse oder -frequenz eingrenzen. Obwohl Effekte auf die Mahlzeitenfrequenz beschrieben sind, scheint auch insbesondere die Grösse der ersten Mahlzeit nach der Inaktivitätsphase durch Ghrelin gesteigert zu werden (Tschöp et al., 2000; Toshinai et al., 2001; Faulconbridge et al., 2003). Aus diesen Befunden lassen sich allerdings keine direkten Rückschlüsse auf die Effekte der getesteten IA auf das Mahlzeitenmuster ableiten. Aufgrund der von Ghrelin unabhängigen inversen Wirkung wurde eine Konzept vorgeschlagen, nach dem die Behandlung mit IA auch während der Intervalle zwischen den Mahlzeiten die Nahrungsaufnahme unterdrückt, wohingegen Ghrelin Antagonisten in erster Linie die Wirkung auf steigende Ghrelinspiegel vor den Mahlzeiten beeinflussen (Holst et al., 2003; Holst und Schwartz, 2004). Daraus resultierende Effekte, die sich möglicherweise in Bezug auf das Mahlzeitenmuster ergeben, wurden allerdings bislang nicht experimentell verifiziert.

Es existieren nur wenige Studien, in denen der Effekt von IA auf die Energiehomöostase untersucht wurde, was vermutlich auf den Mangel an geeigneten IA zurückzuführen ist. Als einer der ersten IA wurde ein Substanz P Analog getestet, das nach chronischer zentraler Verabreichung die Nahrungsaufnahme reduzierte (Petersen et al., 2009). Die Befunde von Studien, in denen Ghrelin Antagonisten in vivo charakterisiert wurden, sind heterogen. In zwei Studien wurden paradoxerweise orexigene Effekte von Ghrelin Antagonisten beschrieben. Inwieweit diese Effekte eventuell auf partiell erregende Eigenschaften dieser Substanzen beruhen könnten, ist unklar (Costantini et al., 2011; Hassouna et al., 2013). In zwei weiteren Studien führten andere Ghrelin Antagonisten, in Einklang mit der erwarteten Wirkung, zu einer Hemmung der Nahrungsaufnahme. Im

Gegensatz zu den zuvor genannten Versuchen der vorliegenden Studie mit IA wurden allerdings in diesen Versuchen ein Futterentzug von 16 Stunden bzw. 24 Stunden durchgeführt (engl. *fasting-refeeding*) (Asakawa et al., 2003; Rudolph et al., 2007). Ob diese Antagonisten auch in ad libitum gefütterten Versuchstieren die Nahrungsaufnahme hemmen, wurde nicht untersucht. Trotzdem ist es naheliegend anzunehmen, dass die Wirksamkeit von Ghrelin Antagonisten vom Fütterungsstatus abhängig ist; dies steht im Gegensatz zum Effekt von IA, da IA auch unabhängig von einem Anstieg des Ghrelinspiegels, z.B. infolge eines Futterentzugs, wirken können. Der in der vorliegenden Studie durchgeführte Futterentzug von 3 Stunden am Ende der Inaktivitätsphase kann in Bezug auf eine derartige Wirkung als gering betrachtet werden. Er hatte nicht das Ziel oder die Wirkung, die Tiere in einen ausgeprägten Hungerzustand zu versetzen, sondern wurde als experimentelle Massnahme eingesetzt, um die Gruppenvariabilität der Nahrungsaufnahme zu Beginn der Dunkelphase zu reduzieren. Zusammenfassend bestätigen die durchgeführten Verhaltensstudien die erwartete Wirkung der IA. Obwohl auch nach oraler Applikation eine Reduktion der Nahrungsaufnahme erfolgte, war der Effekt verglichen mit der Wirkung nach parenteraler Verabreichung schwächer. Für eine mögliche therapeutische Verwendung mittels oraler Verabreichung wäre also eine Optimierung der diesbezüglichen pharmakokinetischen Eigenschaften erforderlich.

Aversiv wirksame Substanzen wie LiCl (Smith, 1978) oder auch das gastrointestinale Hormon GLP-1 (Kinzig et al., 2002; Kanoski et al., 2012) induzieren viszerale Unwohlsein und können die Nahrungsaufnahme reduzieren. In dieser Arbeit sollte daher mittels einer auf CTA basierenden Studie ausgeschlossen werden, dass eine reduzierte Futteraufnahme aufgrund eines aversiven Effekts der IA zustande gekommen ist. Dieser Versuch wurde mit dem am weitesten entwickelten IA3 durchgeführt, dessen experimentelles Design aus früheren Studien übernommen wurde (Sisley et al., 2014).

LiCl induzierte offensichtlich ein starkes viszerale Unwohlsein in den Mäusen, da nach entsprechender Konditionierung die Saccharinaufnahme nach 4 Stunden um etwa 80% und nach 24 Stunden um etwa 74% reduziert war. Im Gegensatz zur Positivkontrollgruppe, war die Saccharinaufnahme in der IA3 behandelten Versuchsgruppe ähnlich hoch wie in der negativen Kontrollgruppe. Obwohl eine CTA Studie nicht alle negativen Nebenwirkungen einer Testsubstanz ausschliessen kann,

gilt ein negativer CTA Versuch als ein wichtiges Kriterium beim Ausschluss von akut noxischen Stimuli als mögliche Ursache einer verringerten Nahrungsaufnahme. Insbesondere scheint er bei Mäusen zuverlässiger zu sein als andere Verhaltenstests, die ebenfalls zu diesem Zweck eingesetzt werden.

Eine alternative Methode besteht in der Analyse des sogenannten Pica Verhaltens, das sich durch die Aufnahme von nicht-nutritiven Materialien infolge aversiv wirkender Stimuli auszeichnet. Bei experimentellen Tests zum Pica Verhalten wird häufig die Aufnahme von Kaolin (Tonerde) nach einem aversiven Teststimulus gemessen. Ein derartiger Test wurde ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführt, wobei keine signifikant erhöhte Kaolinaufnahme nach Verabreichung des Positivstimulus LiCl auftrat (Resultate nicht gezeigt). Für das Pica Modell wurde ein Speziesunterschied zwischen Ratten und Mäusen beschrieben. Während Ratten nach Verabreichung von Cisplatin ein Pica Verhalten zeigen, verläuft der Test bei Mäusen offenbar negativ (Liu et al., 2005). Da es nicht das Ziel dieser Studie war, die Eignung des Pica-Modells weiter zu validieren, wurde die oben beschriebene CTA Studie durchgeführt, deren Resultat einen aversiven Mechanismus als Ursache für die IA3 vermittelte Hemmung der Futteraufnahme weitestgehend ausschliesst.

Basierend auf den Resultaten dieser Arbeit ist es Gegenstand weiterführender Studien, therapeutische Effekte auf Adipositas bedingten Diabetes mellitus Typ 2 nach chronischer Verabreichung zu evaluieren. In einer parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Studie wurde der Effekt einer chronischen Behandlung mit IA3 auf das Körpergewicht, die Futteraufnahme und Insulinsensitivität in adipös-diabetischen ZDF (engl. *sucker diabetic fatty*) Ratten untersucht. ZDF Ratten zeigen eine ausgeprägte Adipositas, Hyperlipidämie, Hyperinsulinämie und Diabetes mellitus Typ 2. Mit 6-7 Wochen entwickeln ZDF Ratten zunehmende Insulinresistenz; mit 10-12 Wochen steigt der Glukosespiegel stetig (Etgen und Oldham, 2000; Harmon et al., 2001). Diese chronische Studie wurde bei etwa 10 Wochen alten ZDF Ratten durchgeführt, d.h. in einem Alter, in der sich eine zunehmende Glukoseintoleranz entwickelt (Etgen und Oldham, 2000; Harmon et al., 2001). Eine tägliche Behandlung mit IA3 (20mg/kg; i.p.) für 10 Tage führte zu einer verminderten Nahrungsaufnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe. Obwohl kein signifikanter Effekt auf das Körpergewicht auftrat, war bei den IA3 behandelten ZDF Ratten die Glukosetoleranz nach oraler Gabe von Glukose deutlich verbessert (unpublizierte Daten).

Zusammenfassend bestätigen die Resultate der vorliegenden Studien weitestgehend die postulierten Wirkungsweisen der getesteten IA und legen eine mögliche therapeutische Verwendung zur Behandlung von Adipositas und metabolischen Begleiterkrankungen wie Diabetes Typ 2 nahe. Obwohl deutliche Effekte auf die Nahrungsaufnahme und auf die neuronale Aktivität *in vivo* belegt wurden, gibt es insbesondere im Hinblick auf die Effektivität nach oraler Applikation noch Verbesserungspotential, welches in der weiterführenden Entwicklung der getesteten IA ausgeschöpft werden könnte.

## 7. Literaturverzeichnis

- Adeghate, E., Ponery, A.S. (2002): Effect of adrenergic and cholinergic neurotransmitters on insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *Biogenic Amines*, **17**, 61–69.
- Arnelo, U., Reidelberger, R., Adrian, T. (1998): Sufficiency of postprandial plasma levels of islet amyloid polypeptide for suppression of feeding in rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **275**, R1537–R1542.
- Asakawa, A., Inui, A., Kaga, T., Yuzuriha, H., Nagata, T., Ueno, N., Makino, S., Fujimiya, M., Nijima, A., Fujino, M., Kasuga, M. (2001): Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*, **120**, 337–345.
- Banks, W.A. (2006): The blood – brain barrier as a regulatory interface in the gut – brain axes. *Physiology and Behavior*, **89**, 472–476.
- Baskin, D.G., Figlewicz Latteman, D., Seeley, R.J., Woods, S.C., Porte Jr., D., Schwartz, M.W. (1999): Insulin and leptin:dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Research*, **848**, 114–123.
- Batterham, R., Cowley, M., Small, C. et al. (2002): Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*, **418**, 650–654.
- Batterham, R., Cowley, M., Small, C., Herzog, H., Cohen, M., Dakin, C., Wren, A., Brynes, A., Low, M., Ghatei, M., Cone, R., Bloom (2004): Does gut hormone PYY3-36 decrease food intake in rodents? Reply. *Nature*, **168**, 8–9.
- Becskei, C., Bilik, K.U., Klusmann, S., Jarosch, F., Lutz, T. A., Riediger, T. (2008): The anti-ghrelin Spiegelmer NOX-B11-3 blocks ghrelin- but not fasting-induced neuronal activation in the hypothalamic arcuate nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, **20**, 85–92.
- Becskei, C., Lutz, T. A., Riediger, T. (2008): Glucose reverses fasting-induced activation in the arcuate nucleus of mice. *Neuroreport*, **19**, 105–9.
- Becskei, C., Lutz, T. A., Riediger, T. (2009a): Diet-derived nutrients mediate the inhibition of hypothalamic NPY neurons in the arcuate nucleus of mice during refeeding. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **297**, R100–R110.
- Becskei, C., Lutz, T. A., Riediger, T. (2009b): Blunted fasting-induced hypothalamic activation and refeeding hyperphagia in late-onset obesity. *Neuroendocrinology*, **90**, 371–382.
- Becskei, C., Lutz, T. A., Riediger, T. (2010): Reduced fasting-induced activation of hypothalamic arcuate neurons is associated with hyperleptinemia and increased

- leptin sensitivity in obese mice. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **299**, R632–R641.
- Bednarek, M.A., Feighner, S.D., Pong, S., Mckee, K.K., Hreniuk, D.L., Silva, M. V, Warren, V.A., Howard, A.D., Van der Ploeg, L.H.Y., Van der, Heck, J. (2000): ghrelin : minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth. *Journal of Medicinal Chemistry*, **43**, 4370–4376.
- Berridge, K. (2004): Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiology and Behavior*, **81**, 179–209.
- Berthoud, H.R. (2006): Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity*, **14**, 197S–200S.
- Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., Hökfelt, T. (1998): The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 15043–15048.
- Broglio, F., Arvat, E., Benso, A., Gottero, C., Muccioli, G., Papotti, M., Van der Lely, A.J., Deghenghi, R., Ghigo, E. (2001): Ghrelin, a natural GH Secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86(10)**, 5083–5086.
- Chacko, S.K., Haymond, M.W., Sun, Y., Marini, J.C., Sauer, P.J.J., Ma, X., Sunehag, A. L. (2012): Effect of ghrelin on glucose regulation in mice. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, **302**, E1055–E1062.
- Challis, B.G., Pinnock, S.B., Coll, A. P., Carter, R.N., Dickson, S.L., O’Rahilly, S. (2003): Acute effects of PYY3-36 on food intake and hypothalamic neuropeptide expression in the mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **311**, 915–919.
- Chandra, R. und Liddle, R.A. (2007): Cholecystikinin. *Current opinion in endocrinology, Diabetes & Obesity*, **14**, 63–67.
- Chapman, I., Bach, M., Cauter, E. Van, Farmer, M., Krupa, D., Taylor, A., Gormely, G., Thorner, M. (1996): Stimulation of the growth hormone (GH)-insulin-like growth factor 1 axis by daily oral administration of a GH secretagogue (MK-677) in healthy elderly subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **81**, 4249–4257.
- Chelikani, P.K., Haver, A.C., Heidelberger, R.D. (2005): Intravenous infusion of peptide YY(3-36) potently inhibits food intake in rats. *Endocrinology*, **146**, 879–888.
- Chollet, C., Meyer, K., Beck-Sickinger, A.G. (2009): Ghrelin - A novel generation of anti-obesity drug: Design, pharmacomodulation and biological activity of ghrelin analogues. *Journal of Peptide Science*, **15**, 711–730.

- Chronwall, B. (1985): Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides*, **6**, 1–11.
- Chua, S.C., Chung, W.K., Wu-Peng, X.S., Zhang, Y., Liu, S.M., Tartaglia, L., Leibel, R.L. (1996): Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*, **271**, 994–996.
- Coppola, A., Liu, Z.W., Andrews, Z.B., Paradis, E., Roy, M.C., Friedman, J.M., Ricquier, D., Richard, D., Horvath, T.L., Gao, X.B., Diano, S. (2007): A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metabolism*, **5**, 21–33.
- Costantini, V.J.A, Vicentini, E., Sabbatini, F.M., Valerio, E., Lepore, S., Tessari, M., Sartori, M., Michielin, F., Melotto, S., Merlo Pich, E., Corsi, M. (2011): GSK1614343, a novel ghrelin receptor antagonist, produces an unexpected increase of food intake and body weight in rodents and dogs. *Neuroendocrinology*, **94**, 158–168.
- Cowley, M. A, Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., Low, M.J. (2001): Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, **411**, 480–484.
- Creutzfeld, W. (1979): The incretin concept today. *Diabetologia*, **16**, 75–85.
- Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., Weigle, D.S. (2001): A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, **50**, 1714–1719.
- Cummings, D.E., Weigle, D.S., Frayo, R.S., Breen, P. A., Ma, M.K., Dellinger, E.P., Purnell, J.Q. (2002): Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *New England Journal of Medicine*, **346**, 1623–1630.
- Date, Y., Nakazato, M., Hashiguchi, S., Dezaki, K., Mondal, M.S., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Arima, T., Matsuo, H., Yada, T., Matsukura, S. (2002): Ghrelin is present in pancreatic  $\alpha$ -cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes*, **51**, 124–129.
- Dezaki, K., Hosoda, H., Kakei, M., Hashiguchi, S., Watanabe, M., Kangawa, K., Yada, T. (2004): endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in beta cells. *Diabetes*, **53**, 3142–3151.
- Egido, E., Rodriguez-Gallardo, J., Silvestre, R., Marco, J. (2002): Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *European Journal of Endocrinology*, **146**, 241–244.
- Ellacott, K.L.J., Cone, R.D. (2004): The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis. *Recent Progress in Hormone Research*, **59**, 395–408.

- Elmqvist, J.K., Coppari, R., Balthasar, N., Ichinose, M., Lowell, B.B. (2005): Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *Journal of Comparative Neurology*, **493**, 63–71.
- Els, S., Beck-Sickinger, A.G., Chollet, C. (2010): Ghrelin receptor. High constitutive activity and methods for developing inverse agonists. *Methods of Enzymology*, **485**, 103–121.
- Emond, M., Ladenheim, E., Schwartz, G., Moran, T. (2001): Leptin amplifies the feeding inhibition and neural activation arising from a gastric nutrient preload. *Physiology and Behavior*, **72**, 123–128.
- Emond, M., Schwartz, G., Ladenheim, E., Moran, T. (1999): Central leptin modulates behavioral and neural responsivity to CCK. *American Journal of Physiology*, **276**, R1545–R1549.
- Etgen, G. und Oldham, B. (2000): Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state. *Metabolism: Clinical and Experimental Metabolism*, **49**, 684–688.
- Faulconbridge, L., Cummings, D.E., Kaplan, J.M., Grill, H.J. (2003): Hyperphagic effects of brainstem ghrelin administration. *Diabetes*, **52**, 2260–2265.
- Gan, D. (2003): In: Gan, D. (Hrsg.): *Diabetes Atlas*. 2. Aufl., International Diabetes Federation, Brüssel.
- Gauna, C., Van de Zande, B., Van Kerkwijk, A., Themmen, A.P.N., Van der Lely, A. J., Delhanty, P.J.D. (2007): Unacylated ghrelin is not a functional antagonist but a full agonist of the type 1a growth hormone secretagogue receptor (GHS-R). *Molecular and Cellular Endocrinology*, **274**, 30–34.
- Gekle, M. (2010): Regulation der Nahrungsaufnahme. In: Gekle M., Wischmeyer E., Gründer S., Petersen M., Schwab A. (Hrsg.): *Taschenlehrbuch Physiologie*. 1. Aufl., Thieme, Stuttgart, S. 414–416.
- Gibbs, J., Young, R., Smith, G. (1973): Cholecystokinin decreases food intake in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, **84**, 488–495.
- Granata, R., Settanni, F., Biancone, L., Trovato, L., Nano, R., Bertuzzi, F., Destefanis, S., Annunziata, M., Martinetti, M., Catapano, F., Ghè, C., Isgaard, J., Papotti, M., Ghigo, E., Muccioli, G. (2007): Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic  $\beta$ -cells and human islets: Involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidyl inositol . *Endocrinology*, **148**, 512–529.
- Grider, J.R. (1994): role of cholecystokinin in the regulation of gastrointestinal motility. *The Journal of Nutrition*, **124**, 1334–1339.



- Gutierrez, J. A., Solenberg, P.J., Perkins, D.R., Willency, J. A., Knierman, M.D., Jin, Z., Witcher, D.R., Luo, S., Onyia, J.E., Hale, J.E. (2008): Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 6320–6325.
- Harmon, J.S., Gleason, C.E., Tanaka, Y., Poitout, V., Robertson, R.P. (2001): antecedent hyperglycemia, not hyperlipidemia, is associated with increased islet triacylglycerol content and decreased insulin gene mRNA level in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes*, **50**, 2481–2486.
- Hassouna, R., Labarthe, A., Zizzari, P., Videau, C., Culler, M., Epelbaum, J., Tolle, V. (2013): Actions of agonists and antagonists of the ghrelin/GHS-R pathway on GH secretion, appetite, and cFos activity. *Frontiers in Endocrinology*, **4**, 1–9.
- Hewson, A K., Viltart, O., McKenzie, D.N., Dyball, R.E., Dickson, S.L. (1999): GHRP-6-induced changes in electrical activity of single cells in the arcuate, ventromedial and periventricular nucleus neurons [correction of nuclei] of a hypothalamic slice preparation in vitro. *Journal of Neuroendocrinology*, **11**, 919–923.
- Heymsfield, S.B., Greenberg, A.S., Fujioka, K., Dixon, R.M., Kushner, R., Hunt, T., Lubina, J. A., Patane, J., Self, B., Hunt, P., Mccamish, M. (1999): Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults A randomized, controlled, dose-escalation trial. *Journal of the American Medical Association*, **282**, 1568–1575.
- Holst, B., Cygankiewicz, A., Jensen, T.H., Ankersen, M., Schwartz, T.W. (2003): High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Molecular Endocrinology*, **17**, 2201–2210.
- Holst, B. und Schwartz, T.W. (2004): Constitutive ghrelin receptor activity as a signaling set-point in appetite regulation. *Trends in Pharmacological Sciences*, **25**, 113–117.
- Holst, J.J. (2007): The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiological Review*, **87**, 1409–1439.
- Howard, A D., Feighner, S.D., Cully, D.F., Arena, J.P., Liberators, P. A., Rosenblum, C.I., Hamelin, M., Hreniuk, D.L., Palyha, O.C., Anderson, J., Paress, P.S., Diaz, C., Chou, M., Liu, K.K., McKee, K.K., Pong, S.S., Chaung, L.Y., Elbrecht, A., Dashkevich, M., Heavens, R., Rigby, M., Sirinathsinghji, D.J., Dean, D.C., Melillo, D.G., Patchett, A.A., Nargund, R., Griffin, P.R., Demartino, J.A., Gupta, S.K., Schaeffer, J.M., Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H. (1996): A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, **273**, 974–977.
- Iwakura, H., Hosoda, K., Son, C., Fujikura, J., Tomita, T., Noguchi, M., Ariyasu, H., Takaya, K., Masuzaki, H., Ogawa, Y., Hayashi, T., Inoue, G., Akamizu, T., Hosoda, H., Kojima, M., Itoh, H., Toyokuni, S., Kangawa, K., Nakao, K. (2005): Analysis of rat insulin II promoter-ghrelin transgenic mice and rat glucagon

- promoter-ghrelin transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 15247–15256.
- Kageyama, H., Funahashi, H., Hirayama, M., Takenoya, F., Kita, T., Kato, S., Sakurai, J., Lee, E.Y., Inoue, S., Date, Y., Nakazato, M., Kangawa, K., Shioda, S. (2005): Morphological analysis of ghrelin and its receptor distribution in the rat pancreas. *Regulatory Peptides*, **126**, 67–71.
- Kalra, S.P., Dube, M.G., Pu, S., Xu, B., Horvath, T.L, Kalra, P.S. (1999): Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Reviews*, **20**, 68–100.
- Kanoski, S., Rupperecht, L., Fortin, S., De Jonghe, B., Hayes, M. (2012): The role of nausea in food intake and body weight suppression by peripheral GLP-1 receptor agonists, exendin-4 and liraglutide. *Neuropharmacology*, **62**, 1916–1927.
- Kinzig, K., D'Alessio, D. A. und Seeley, R.J. (2002): The diverse roles of specific GLP-1 receptors in the control of food intake and the response to visceral illness. *Journal of Neuroscience*, **22**, 10470–10476.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., Kangawa, K. (1999): Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, **402**, 656–660.
- Kreymann, B., Ghatti, M. A, Williams, G., Bloom, S.R. (1987): Glucagon-like peptide-1 7-36: A physiological incretin in man. *Lancet*, **2**, 1300–1304.
- Lane, M., Flores-Riveros, J., Hresko, R., Kaestner, K., Liao, K., Janicot, M., Hoffman, R., McLenithan, J., Kastelic, T., Christy, R. (1990): Insulin-receptor tyrosine kinase and glucose transport. *Diabetes Care*, **13**, 565–575.
- Liu, Y.L., Malik, N., Sanger, G.J., Friedman, M.I., Andrews, P.L.R. (2005): Pica - A model of nausea? Species differences in response to cisplatin. *Physiology and Behavior*, **85**, 271–277.
- Longo, K. A, Govek, E.K., Nolan, A, Mcdonagh, T., Charoenthongtrakul, S., Giuliana, D.J., Morgan, K., Hixon, J., Zhou, C.S., Kelder, B., Kopchick, J.J., Saunders, J.O., Navia, M. A, Curtis, R., Distefano, P.S. , Geddes, B.J. (2011): Pharmacologic inhibition of ghrelin receptor signaling is insulin sparing and promotes insulin sensitivity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **339**, 115–124.
- Lutz, T.A., Del Prete, E., Scharer, E. (1994): Reduction of food intake in rats by intraperitoneal injection of low doses of amylin. *Physiology and Behavior*, **55**, 891–895.
- Lutz, T.A., Geary, N., Szabady, M. (1995): Amylin decreases meal size in rats. *Physiology and Behavior*, **58**, 1197–1202.

- Lutz, T.A. und Bueter, M. (2014): Physiological mechanisms behind Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Digestive Surgery*, **31**, 13–24.
- Ma, X., Lin, L., Qin, G., Lu, X., Fiorotto, M., Dixit, V., Sun, Y. (2011): Ablations of ghrelin and ghrelin receptor exhibit differential metabolic phenotypes and thermogenic capacity during aging. *PLoS ONE*, **6**, e16391.
- Matson, C., Reid, D., Cannon, T., Ritter, R. (2000): Cholecystokinin and leptin act synergistically to reduce body weight. *American Journal of Physiology*, **278**, R882–R890.
- Matson, C., Wiater, M., Kuijper, J., Weigle, D. (1997): Synergy between leptin and cholecystokinin (CCK) to control daily caloric intake. *Peptides*, **18**, 1275–1278.
- Matsumoto, M., Hosoda, H., Kitajima, Y., Morozumi, N., Minamitake, Y., Tanaka, S., Matsuo, H., Kojima, M., Hayashi, Y., Kangawa, K. (2001): Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **287**, 142–146.
- McFarlane, S.I. (2009): Insulin Therapy and Type 2 Diabetes: Management of Weight Gain. , **11**, 601–608.
- Meister, B. (2007): Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiology and Behavior*, **92**, 263–271.
- Mistry, A M., Helferich, W., Romsos, D.R. (1994): Elevated neuronal c-Fos-like immunoreactivity and messenger ribonucleic acid (mRNA) in genetically obese (ob/ob) mice. *Brain Research*, **666**, 53–60.
- Morikawa, Y., Ueyama, E., Senba, E. (2004): fasting-induced activation of mitogen-activated protein kinases ( ERK / p38 ) in the mouse hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*, **16**, 105–112.
- Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., Schwartz, M.W. (2006): Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, **443**, 289–295.
- Muller, A., Janssen, J., Hofland, L.J., Lamberts, S., Bidlingmaier, M., Strasburger, C., Van der Lely, A. (2001): Blockade of the growth hormone (GH) receptor unmasks rapid GH-releasing peptide-6-mediated tissue-specific insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 590–593.
- Nagaya, N., Kojima, M., Uematsu, M., Yamagishi, M., Hosoda, H., Oya, H., Hayashi, Y., Kangawa, K. (2001): Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **280**, R1483–R1487.

- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., Matsukura, S. (2001): A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, **409**, 194–198.
- Näslund, E., King, N., Mansten, S., Adner, N., Holst, J.J., Gutniak, M., Hellström, P. (2004): Prandial subcutaneous injections of glucagon-like peptide-1 cause weight loss in obese human subjects. *British Journal of Nutrition*, **91**, 439–446.
- Nauck, M., Stöckmann, F., Ebert, R., Creutzfeld, W. (1986): Reduced incretin effect in type 2 (noninsulin- dependent) diabetes. *Diabetologia*, **29**, 46–52.
- Niswender, K., Pi-Sunyer, X., Buse, J., Jensen, K.H., Toft, A. D., Russell-Jones, D., Zinman, B. (2013): Weight change with liraglutide and comparator therapies: An analysis of seven phase 3 trials from the liraglutide diabetes development programme. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **15**, 42–54.
- Orskov, C., Wettergren, A., Holst, J.J. (1996): Secretion of the incretin hormones glucagon-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide correlates with insulin secretion in normal man throughout the day. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **31**, 665–670.
- Petersen, K., Laurent, D., Rothman, D., Cline, G., Shulman, G. (1998): Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans. *Journal of Clinical Investigation*, **101**, 1203–1209.
- Petersen, P.S., Woldbye, D.P.D., Madsen, A.N., Egerod, K.L., Jin, C., Lang, M., Rasmussen, M., Beck-Sickinger, A.G., Holst, B. (2009): In vivo characterization of high basal signaling from the ghrelin receptor. *Endocrinology*, **150**, 4920–4930.
- Pournaras, D., Osborne, A., Hawkins, S. et al. (2010): The gut hormone response following Rouxen-Y gastric bypass: cross-sectional and prospective study. *Obesity Surgery*, **20**, 56–60.
- Raybould, H. (2007): Mechanisms of CCK signaling from gut to brain. *Current Opinion in Pharmacology*, **7**, 570–574.
- Reimer, M.K., Pacini, G., Ahrén, B. (2003): Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology*, **144**, 916–921.
- Riediger, T., Traebert, M., Schmid, H. A., Scheel, C., Lutz, T.A., Scharrer, E. (2003): Site-specific effects of ghrelin on the neuronal activity in the hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience Letters*, **341**, 151–155.
- Riediger, T., Bothe, C., Becskei, C., Lutz, T. A. (2004): Peptide YY directly inhibits ghrelin-activated neurons of the arcuate nucleus and reverses fasting-induced c-Fos expression. *Neuroendocrinology*, **79**, 317–326.
- Riedy, C., Chavez, M., Figlewicz, D., Woods, S. (1995): Central insulin enhances sensitivity to cholecystokinin. *Physiology and Behavior*, **58**, 755–760.

- Rodríguez, A, Gómez-Ambrosi, J., Catalán, V., Gil, M.J., Becerril, S., Sáinz, N., Silva, C., Salvador, J., Colina, I., Frühbeck, G. (2009): Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. *International Journal of Obesity* (2005), **33**, 541–552.
- Rosetti, L. und Giaccari, A. (1990): Relative contribution of glycogen synthesis and glycolysis to insulin-mediated glucose uptake. A dose-response euglycemic clamp study in normal and diabetic rats. *Journal of Clinical Investigation*, **85**, 1785–1792.
- Roux, C. Le, Aylwin, S., Batterham, R., Borg, C.M., Coyle, F., Prasad, V., Shurey, S., Ghatei, M., Patel, A.G., Bloom, S.R. (2006): Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Annals of Surgery*, **243**, 108–114.
- Roux, C. Le, Welbourn, R., Werling, M., Osborne, A., Kokkinos, A., Laurenus, A., Lönroth, H., Fändriks, L., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., Olbers, T. (2007): Gut hormones as mediators of appetite and weight loss after Roux-en-Y gastric bypass. *Annals of Surgery*, **246**, 780–785.
- Roux, C. Le, Borg, C., Wallis, K., Vincent, R.P., Bueter, M., Goodlad, R., Ghatei, M.A., Patel, A., Bloom, S.R., Aylwin, S.J. (2010): Gut hypertrophy after gastric bypass is associated with increased glucagon-like peptide 2 and intestinal crypt cell proliferation. *Annals of Surgery*, **252**, 50–56.
- Rudolph, J., Esler, W.P., Connor, S.O., Coish, P.D.G., Wickens, P.L., Brands, M., Bierer, D.E., Bloomquist, B.T., Bondar, G., Chen, L., Claus, T.H., Fathi, Z., Fu, W., Khire, U.R., Kristie, J. A, Lowe, D.B., McClure, A.C., Michels, M., Ortiz, A. A, Ramsden, P.D., Schoenleber, R.W., Shelekhin, T.E., Vakalopoulos, A., Tang, W., Yi, L., Gardell, S.J., Livingston, J.N., Sweet, L.J., Bullock, W.H. (2007): quinazolinone derivatives as orally available ghrelin receptor antagonists for the treatment of diabetes and obesity. *Journal of Medicinal Chemistry*, **50**, 5202–5216.
- Ryabinin, A.E., Wang, Y.M., Finn, D. A. (1999): Different levels of Fos immunoreactivity after repeated handling and injection stress in two inbred strains of mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **63**, 143–151.
- Salehi, A., Dornonville De La Cour, C., Hakanson, R., Lundquist, I. (2004): Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice. *Regulatory Peptides*, **118**, 143–150.
- Schwartz, G.J., Moran, T.H., White, W.O., Ladenheim, E.E. (1997): Relationships between gastric motility and gastric vagal afferent responses to CCK and GRP in rats differ. *The American Journal of Physiology*, **272**, R1726–R1733.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte Jr, D., Seeley, R.J., Baskin, D.G. (2000): Central nervous system control of food intake. *Nature*, **404**, 661–671.

- Shiia, T., Nakazato, M., Mizuta, M., Date, Y., Mondal, M.S., Tanaka, M., Nozoe, S.-I., Hosoda, H., Kangawa, K., Matsukura, S. (2002): Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 240–244.
- Shin, A., Zheng, H., Townsend, R., Sigalet, D., Berthoud, H.R. (2010): Meal-induced hormone responses in a rat model of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Endocrinology*, **151**, .
- Sisley, S., Gutierrez-Aguilar, R., Scott, M., D'Alessio, D. A., Sandoval, D.A., Seeley, R.J. (2014): Neuronal GLP1R mediates liraglutide's anorectic but not glucose-lowering effect. *Journal of Clinical Investigation*, **124**, 2456–2463.
- Smith, D. (1978): Learned aversion and rearing movement in rats given LiCl, PbCl<sub>2</sub> or NaCl. *Experientia*, **34**, 1200–1201.
- Song, L., Zhu, Q., Liu, T., Yu, M., Xiao, K., Kong, Q., Zhao, R., Li, G.D., Zhou, Y. (2013): Ghrelin Modulates lateral amygdala neuronal firing and blocks acquisition for conditioned taste aversion. *PLoS ONE*, **8**, .
- Spanswick, D., Smith, M. A, Groppi, V.E., Logan, S.D., Ashford, M.L. (1997): Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature*, **390**, 521–525.
- Sun, Y., Asnicar, M., Saha, P., Chan, L., Smith, R.G. (2006): Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metabolism*, **3**, 379–386.
- Svensson, J., Lönn, L., Jansson, J.O., Murphy, G., Wyss, D., Krupa, D., Cerchio, K., Polvino, W., Gertz, B., Boseaus, I., Sjöström, L., Bengtsson, B.Å. (1998): Two-month treatment of obese subjects with the oral growth hormone (GH) secretagogue MK-677 increases GH secretion, fat-free mass, and energy expenditure. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **83**, 362–369.
- Toshinai, K., Mondal, M.S., Nakazato, M., Date, Y., Murakami, N., Kojima, M., Kangawa, K., Matsukura, S. (2001): Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **281**, 1220–1225.
- Traebert, M., Riediger, T., Whitebread, S., Scharrer, E., SchmiD, H. (2002): Ghrelin acts on leptin-responsive neurones in the rat arcuate nucleus. *Journal of Endocrinology*, **14**, 580–586.
- Tschöp, M., Smiley, D.L., Heiman, M.L. (2000): Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, **407**, 908–913.
- Volante, M., Allia, E., Gugliotta, P., Funaro, A., Broglio, F., Deghenghi, R., Muccioli, G., Ghigo, E., Papotti, M. (2002): Expression of ghrelin and the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 1300–1308.

- Vrang, N., Madsen, A.N., Tang-Christensen, M. et al. (2006): PYY ( 3 – 36 ) reduces food intake and body weight and improves insulin sensitivity in rodent models of diet-induced obesity. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **291**, 367–375.
- Wang, L., Martinez, V., Barrachina, M., Tache, Y. (1998): Fos expression in the brain induced by peripheral injection of CCK or leptin plus CCK in fasted lean mice. *Brain research*, **791**, 157–166.
- Wang, L., Saint-Pierre, D.H., Taché, Y. (2002): Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience Letters*, **325**, 47–51.
- Wierup, N., Svensson, H., Mulder, H., Sundler, F. (2002): The ghrelin cell: A novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regulatory Peptides*, **107**, 63–69.
- Wierup, N., Yang, S., McEvelly, R.J., Mulder, H., Sundler, F. (2004): Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, **52**, 301–310.
- Willesen, M., Kristensen, P., Romer, J. (1999): Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology*, **70**, 306–316.
- Woods, S.C., Lotter, E., McKay, L., Porte, D. (1979): Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature*, **282**, 503–505.
- Woods, S.C., Seeley, R.J., Porte, D., Schwartz, M.W. (1998): Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, **280**, 1378–1383.
- Woods, S.C., Seeley, R.J., Baskin, D.G., Schwartz, M.W. (2003): Insulin an the blood-brain barrier. *Current Pharmaceutical Design*, **9**, 795–800.
- Woods, S.C., Benoit, S.C., Clegg, D.J., Seeley, R.J. (2004): Regulation of energy homeostasis by peripheral signals. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, **18**, 497–515.
- Yang, J., Brown, M.S., Liang, G., Grishin, N.V., Goldstein, J.L. (2008): Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*, **132**, 387–396.
- Yki-Jarvinen, H., Helve, E., Sane, T., Nurjhan, N., Taskinen, M. (1989): Insulin inhibition of overnight glucose production and gluconeogenesis from lactate in NIDDM. *American Journal of Physiology.*, **256**, E732–739.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maiffei, M. (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **372**, 425–432.

Zorrilla, E.P., Iwasaki, S., Moss, J. A, Chang, J., Otsuji, J., Inoue, K., Meijler, M.M., Janda, K.D. (2006): Vaccination against weight gain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **103**, 13226–13231.



## **8. Danksagung**

An dieser Stelle möchte mich bei allen bedanken, die mich während des letzten Jahres unterstützt und zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Thomas Riediger für das Betreuen der Doktorarbeit und für das Lehren der Arbeitsmethoden.

Prof. Dr. Thomas Lutz für die Überlassung des Themas und für seine offene und freundliche Art.

Prof. Dr. Wolfgang Langhans für die Übernahme des Korreferats.

Helsinn Healthcare SA für die gute Zusammenarbeit und für die zur Verfügung gestellten Substanzen.

Tito und Kathrin, die mir vor allem bei den Tätigkeiten im Labor unter die Arme gegriffen haben und stets ein offenes Ohr für Fragen hatten.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mir mein Studium ermöglicht und mich in meinen Plänen stets bestärkt haben. Sie waren mir die grösste Stütze während des letzten Jahres und haben mich von Beginn an in Zürich unterstützt. Auch möchte ich mich bei meinen Freunden - insbesondere Swenja - bedanken, mit denen ich eine lustige und unvergessliche Zeit in Zürich verbracht habe.

## 9. Lebenslauf

<b>Name</b>	Melanie Hutter
<b>Geburtsdatum</b>	28.05.1990
<b>Geburtsort</b>	Graz
<b>Nationalität</b>	Österreich
<b>09/1996- 07/2000</b>	Volksschule in Gratkorn, Österreich
<b>09/2000- 06/2008</b>	Gymnasium BG/BRG Kirchengasse, Graz, Österreich
<b>Juni 2008</b>	Matura, BG/BRG Kirchengasse, Graz, Österreich
<b>10/2008-05/2014</b>	Studium der Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Österreich
<b>Mai 2014</b>	Abschluss des Veterinärmedizinstudiums an der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Österreich
<b>07/2014-07/2015</b>	Anfertigung der Dissertation am Institut für Veterinärphysiologie, Direktor: Prof. Dr. Max Gassmann, unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Riediger, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Thomas Lutz, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, ZH, Schweiz